

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Πολυμορφισμοί των μιτοχονδριακών γονιδίων ATP6 και NADH2 ως δείκτες
βιοποικιλότητας**



**ΣΟΥΡΛΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ
-ΛΑΡΙΣΑ 2011-**

**Πολυμορφισμοί των μιτοχονδριακών γονιδίων ATP6 και NADH2 ως δείκτες
βιοποικιλότητας**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:
Μαμούρης Ζήσης
Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:
Μαμούρης Ζήσης :Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Μούτου Αικατερίνη: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών
Σαραφίδου Θεολογία : Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελεγκτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών που με δέχτηκε στο εργαστήριο του ώστε να μπορέσω να εκπονήσω την παρούσα εργασία, την κα. Μούτου Αικατερίνη , Επίκουρο Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών καθώς και την κα. Σαραφίδου Θεολογία, Λέκτορα Μοριακής Γενετικής Ζωικών οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την τιμή που μου κάνουν συμμετέχοντας στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο και Γιαννούλη Θεμιστοκλή για τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχαν στο πειραματικό κομμάτι της εργασίας κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο, τις συμβουλές και τις υποδείξεις τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους με τους οποίους παρευρεθήκαμε, την ίδια χρονική περίοδο στο εργαστήριο, για την προθυμία τους και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ 6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	σελ 7
1.1. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	σελ 7
1.2. ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ.....	σελ 8
1.2.1. Οικολογική ποικιλότητα.....	σελ 8
1.2.2. Ποικιλότητα των ειδών.....	σελ 9
1.2.3. Γενετική Ποικιλότητα.....	σελ 9
1.3. Βιοποικιλότητα και δείκτες.....	σελ 10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	σελ 14
2.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ <i>L.europaes</i>	σελ 14
2.2.Μορφολογία.....	σελ 14
2.3. Προέλευση και εξάπλωση του είδους.....	σελ 15
2.4. Διατροφικές συνήθειες.....	σελ 15
2.5. Κίνδυνοι και Απειλές	σελ 15
2.6. Αναπαραγωγή.....	σελ 16
2.7. Βιότοπος.....	σελ 17
2.8. Παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά.....	σελ 17
2.9. Οικονομική και ερευνητική σημασία του <i>Lepus europaes</i>	σελ 18
2.10. Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής στο είδος <i>L. europaes</i> σε Ευρώπη και Ασία.....	σελ 18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	σελ 20
3. Μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	σελ 20
3.1. Βιολογία και Προέλευση.....	σελ 20
3.2. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	σελ 21
3.3. Χρήση του mtDNA στις φυλογενετικές μελέτες.....	σελ 23
3.3 Το mtDNA ως φυλογενετικός δείκτης.....	σελ 24
3.4 Πολυμορφισμός στο επίπεδο του mtDNA.....	σελ 25
3.5 Μελέτες των πολυμορφισμών στα γονίδια ATP6 και NADH2 σε διάφορους οργανισμούς.....	σελ 25
3.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	σελ 26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	σελ 27

4. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ 27
4.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	σελ 27
4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ 30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	σελ 38
5. ΑΝΑΛΥΣΗ PCR-SSCP.....	σελ 38
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ 56

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Βιοποικιλότητα είναι η ποικιλία της ζωής στη Γη και για τη μέτρηση των πτυχών της χρησιμοποιούνται «δείκτες» που προσφέρουν ένα γρήγορο και εύχρηστο εργαλείο. Με την ανάλυση του γενετικού υλικού (DNA) των οργανισμών, οι επιστήμονες μπορούν να εξάγουν ασφαλή συμπεράσματα για την γενετική δομή των πληθυσμών και την εξελικτική τους ιστορία. Η γνώση αυτή είναι απαραίτητη ώστε να σχεδιαστούν ολοκληρωμένα προγράμματα προστασίας και διαχείρισης των άγριων πληθυσμών, ιδιαίτερα για απειλούμενα είδη ή είδη με οικονομικό ενδιαφέρον.

Στην εργασία αυτή, ελέγχθηκε ο πολυμορφισμός δυο μιτοχονδριακών γονιδίων, των *ATP6* και *NADH2* του είδους *Lepus europaeus*, με PCR- SSCP και ακόλουθη αλληλούχηση των διαφορετικών προτύπων.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε εμφανής ο διαχωρισμός των *Lepus europaeus* που προέρχονται από και τα νησιά του Αιγαίου και την Ανατολή (Τουρκία και Ισραήλ) από τους *Lepus europaeus* της ηπειρωτικής Ελλάδας και της Ευρώπης, γεγονός που είναι σε συμφωνία με προηγούμενα δεδομένα που ανέλυν άλλες περιοχές του μιτοχονδριακού DNA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η βιολογική ποικιλότητα ή βιοποικιλότητα ενός οικοσυστήματος σχετίζεται με την πολυπλοκότητα των σχέσεων και των λειτουργιών των διαφόρων έμβιων ειδών. Όσο μεγαλύτερη είναι η βιοποικιλότητα ενός οικοσυστήματος τόσο περισσότερο σταθερό είναι το παραπάνω. Η λέξη Βιοποικιλότητα, κατέχει κυρίαρχη θέση στο λεξιλόγιο αυτών που ασχολούνται με τη διαχείριση των φυσικών πόρων, ως αποτέλεσμα του ολοένα αυξανόμενου ενδιαφέροντος και της ευαισθησίας της κοινωνίας απέναντι σε ολόκληρο το φάσμα των ζωντανών οργανισμών με τους οποίους μοιραζόμαστε τον πλανήτη γη (Hunder, 2001).

Η ζωή εμφανίζεται επάνω στη Γη με μια σχεδόν ατελείωτη ποικιλία μορφών, από μικροσκοπικούς μονοκύτταρους οργανισμούς μέχρι γιγάντιες φάλαινες και ελέφαντες. Τα διαφορετικά είδη των έμβιων όντων εμπεριέχουν ξεχωριστούς πληθυσμούς με άτομα, που το κάθε ένα είναι αλλιώτικο από το άλλο. Ο κανόνας στη ζωή δεν είναι η ομοιομορφία αλλά η ποικιλία και η διαφορετικότητα. Έτσι η Βιοποικιλότητα πηγάζει από την ιδιότητα των ζωντανών συστημάτων να είναι διαφορετικά και η λέξη προέρχεται από τη σύντμηση του όρου "Βιολογική Ποικιλότητα" ο οποίος εκφράζει την ποικιλία των έμβιων όντων (Μελιάδου, 2000).

Συγκεκριμένα, ως Βιοποικιλότητα ορίζεται η ποικιλία της ζωής σε όλες τις μορφές (π.χ. φυτά, ασπόνδυλα και σπονδυλωτά ζώα, μύκητες, βακτήρια κ.λπ.) και σε όλα τα επίπεδα οργάνωσης. Η έκφραση «όλα τα επίπεδα οργάνωσης» υποδεικνύει ότι η βιοποικιλότητα μπορεί να εκδηλώνεται στη φύση σε πολλαπλά επίπεδα βιολογικής οργάνωσης: ανάμεσα στα διαφορετικά είδη, ανάμεσα στους διάφορους πληθυσμούς του ίδιου είδους, αλλά και ανάμεσα στα άτομα του ίδιου πληθυσμού. Αναφέρεται επίσης και στην ποικιλία των διαφορετικών τύπων οικοσυστημάτων, βιοκοινοτήτων, τοπίων, ή βιο-κατοικιών, που οι οργανισμοί απαρτίζουν, όπως και στις σχέσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στα είδη. Οι διαφορετικές αυτές εκφάνσεις της βιοποικιλότητας εκδηλώνονται μέσα από τον καθορισμό διαφορετικών τύπων Βιοποικιλότητας: Ποικιλότητα ειδών, γενετική ποικιλότητα, ποικιλότητα οικοσυστημάτων, λειτουργική ποικιλότητα (Μελιάδου, 2000).

Ο όρος «Βιοποικιλότητα» αγκαλιάζει όλη τη ζωή στη γη, κάθε μορφή ζωής αποτελεί τη βιολογική ποικιλότητα: φυτά, ζώα, μύκητες και μικροοργανισμούς, τα γονίδια που περιέχουν και τα οικοσυστήματα που σχηματίζουν.

Παρά όμως την απλότητα και σαφήνεια του όρου, το περιεχόμενό του είναι μια από τις πλέον αμφιλεγόμενες έννοιες της οικολογίας. Ο λόγος είναι ότι δεν υπάρχει μία, αλλά πολλές βιοποικιλότητες, σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης της ζωής και ότι δεν είναι ενιαίος ο τρόπος έκφρασης (Ντάφης, 1997).

1.2. ΤΥΠΟΙ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ

Η εμφάνιση νέων γονιδίων σε έναν πληθυσμό, νέων ειδών σε μια βιοκοινότητα ή/και νέων τύπων οικοσυστημάτων στη βιόσφαιρα αυξάνουν τη βιοποικιλότητα του πληθυσμού, της βιοκοινότητας και του πλανήτη αντίστοιχα. Μείωση στη γονιδιακή ποικιλία ενός πληθυσμού, η εξαφάνιση ενός είδους ή/και η αλλοίωση στη σύνθεση ενός οικοσυστήματος μειώνουν τη συνολική βιοποικιλότητα. Πολλές περιοχές του πλανήτη, και κατ' επέκταση η βιοποικιλότητα που τις χαρακτηρίζει, έχουν διαμορφωθεί υπό την επίδραση μακροχρόνιων ανθρωπογενών επεμβάσεων. Προσεγγίζοντας τη βιοποικιλότητα, διακρίνουμε τέσσερα επίπεδα μελέτης της -γονίδια, είδη, οικοσυστήματα και πολιτισμοί- που περιγράφουν και αναλύουν διαφορετικές, αν και αλληλοεξαρτώμενες, πλευρές των ζωντανών συστημάτων (Μαρδίρης, 2005).

Οι Norse et. al (1986) ήταν οι πρώτοι που διέκριναν τη βιοποικιλότητα σε τρεις βασικούς τύπους :

- Οικολογική ποικιλότητα (ποικιλότητα των βιοκοινοτήτων)
- Ποικιλότητα των ειδών (αριθμός ειδών).
- Γενετική ποικιλότητα (ποικιλότητα μέσα στο είδος)

1.2.1. Οικολογική ποικιλότητα

Αυτό το επίπεδο βιοποικιλότητας, γνωστό ως ποικιλότητα οικοσυστημάτων ή φυτοκοινωνιών, εκφράζεται με τον αριθμό των συνδυασμών ειδών φυτών και ζώων που συναντώνται σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Ο αριθμός των οικοσυστημάτων και ο τρόπος κατανομής του στο χώρο χαρακτηρίζει και δίνει τη σφραγίδα του στο τοπίο της κάθε περιοχής (Ντάφης, 1997).

1.2.2. Ποικιλότητα των ειδών

Το δεύτερο επίπεδο βιοποικιλότητας είναι αυτό της βιοποικιλότητας των ειδών φυτών και ζώων. Η βιοποικιλότητα αυτή εκφράζεται με το πλήθος των ειδών φυτών και ζώων που απαντούν σε μια συγκεκριμένη περιοχή (Ντάφης 1997). Όσο περισσότερα είδη μετέχουν στη σύνθεση ενός οικοσυστήματος τόσο μεγαλύτερη σταθερότητα παρουσιάζει το οικοσύστημα.

1.2.3. Γενετική Ποικιλότητα

Ο όρος γενετική ποικιλότητα αναφέρεται στη διαφοροποίηση του γενετικού υλικού μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους και καλύπτει τη γονιδιακή ποικιλότητα (διαφοροποίηση στα ποσοστά των γονιδιακών αλληλομορφών) μεταξύ των πληθυσμών του ίδιου είδους ή/και τη γονιδιακή ποικιλότητα (ποικιλότητα γονιδιακών αλληλομόρφων) μεταξύ των ατόμων του ίδιου πληθυσμού. Στα είδη που αναπαράγονται με αμφιγονία η γενετική ποικιλότητα εμπλουτίζεται περισσότερο καθώς οι απόγονοι (φυτικοί ή ζωικοί οργανισμοί) κληρονομούν από τους γονείς τους έναν μοναδικό πρακτικά συνδυασμό γονιδίων (Μαρδίρης 2005).

Η γενετική βιοποικιλότητα εκφράζει το εύρος των κληρονομικών καταβολών ενός συγκεκριμένου είδους. Όσο μεγαλύτερο είναι το εύρος αυτό, τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητα επιβίωσης του είδους απέναντι σε εξωτερικές πιέσεις. Είναι αυτονόητο ότι τα φυσικά είδη έχουν πολύ μεγαλύτερο εύρος κληρονομικών καταβολών και συνεπώς πολύ μεγαλύτερη αντοχή και ικανότητα επιβίωσης από τα "τεχνητά" ή γενετικά βελτιωμένα είδη (Ντάφης, 1997).

Σύμφωνα με την αρχή της διατήρησης και επιβίωσης του καλύτερα προσαρμοσμένου οργανισμού, την οποία διατύπωσε ο Κάρολος Δαρβίνος το 1859 στο έργο του «Η καταγωγή των ειδών», ο καλύτερα προσαρμοσμένος γενετικός τύπος του είδους θα επικρατήσει, θα πολλαπλασιαστεί ταχύτερα και θα δώσει τη δυνατότητα εξελικτικής πορείας στο είδος. Είναι προφανές πως όσο μεγαλύτερη ποικιλία γενετικών τύπων υπάρχουν τόσο πιθανότερο είναι να επιλεγεί ο πιο προσαρμοσμένος, ο πιο ισχυρός στις νέες συνθήκες.

Η γενετική ποικιλότητα προκύπτει από τις μεταλλάξεις των γονιδίων και τον ανασυνδυασμό τους κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής και αποτελεί ένα μέτρο της ποικιλίας των πληροφοριών που το είδος, ο πληθυσμός ή το άτομο έχει κωδικοποιημένες στα γονίδιά του. Οι τυχαίες μεταβολές που συμβαίνουν στη δομή οργανισμούς (Καρατάσος, 2009).

1.3. Βιοποικιλότητα και δείκτες

Δεδομένου ότι είναι αδύνατη η μέτρηση όλων των πτυχών της βιοποικιλότητας, πολλές φορές χρησιμοποιούνται «δείκτες». Αυτοί συμβάλλουν στον συνοπτικό συνδυασμό σύνθετων και συχνά ασύνδετων ομάδων επιστημονικών στοιχείων κατά τρόπο απλό και κατανοητό. Οι δείκτες βιοποικιλότητας προσφέρουν ένα γρήγορο και εύχρηστο εργαλείο για την παρουσίαση των γενικότερων τάσεων της κατάστασης της βιοποικιλότητας

Οι γενετικές μελέτες βασίζονται σε επιλεκτικά ουδέτερους δείκτες (π.χ. μικροδορυφόροι) και έχουν ως σκοπό την εκτίμηση της διαφοροποίησης και της γενετικής ποικιλομορφίας των φυσικών πληθυσμών, δίνοντας σαφείς ενδείξεις για την επιρροή του περιβάλλοντος σε αυτούς, όπως επίσης και των ανθρώπινων ενεργειών. Ο μηχανισμός ο οποίος διατηρεί τη γενετική ποικιλομορφία, η σχετική συνεισφορά διάφορων γεγονότων μικροεξέλιξης καθώς και η δράση της φυσικής επιλογής η οποία διατηρεί τους προσαρμοστικούς πολυμορφισμούς είναι αντικείμενο της επιστήμης της εξελικτικής βιολογίας. Οι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα περιγράφονται παρακάτω.

A. Μορφολογικοί δείκτες

Πρόκειται για γονίδια που είναι υπεύθυνα για κάποιο μορφολογικό γνώρισμα-χαρακτηριστικό ενός οργανισμού, τα διαφορετικά αλληλόμορφα των οποίων προκαλούν τους διάφορους φαινοτύπους. Είναι οι πρώτοι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν. Ο περιορισμένος αριθμός τους και η μειωμένη πολυμορφικότητα αυτών των δεικτών έκανε επιτακτική την ανάγκη αναζήτησης νέων δεικτών.

B. Βιοχημικοί δείκτες

Η ανακάλυψη του γεγονότος ότι αρκετά ένζυμα εμφάνιζαν ισομορφές οι οποίες παρουσίαζαν διαφορές στην ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα, έδωσε ώθηση στη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας. Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας με την ηλεκτροφόρηση των ενζύμων καθιερώθηκε μετά το 1960 (Lewontin and Hubby, 1966). Τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι είναι οικονομική, σε σχέση με τις πιο σύγχρονες μεθόδους, και αρκετά γρήγορη. Επίσης τα αλληλόμορφα κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες μεντελικοί δείκτες και τα δεδομένα προέρχονται από πρωτεϊνικά προϊόντα που αντιστοιχούν σε σημαντικά γονίδια και συνεπώς αντλούνται σημαντικές πληροφορίες. Σημαντικό όμως μειονέκτημα αυτής της

κατηγορίας δεικτών είναι ότι πολλά ένζυμα είναι μονομορφικά και ότι οι περιπτώσεις αντικατάστασης αμινοξέων που όμως δεν επηρεάζουν το ηλεκτρικό φορτίο του πολυπεπτιδίου, δεν μπορούν να διακριθούν με ηλεκτροφόρηση.

Γ. Δείκτες DNA

Η ανάπτυξη δεικτών DNA αποτέλεσε επανάσταση στην πληθυσμιακή γενετική. Οι νεότερες τεχνικές περιλαμβάνουν τεχνικές δομικής ανάλυσης DNA, όπως λόγω χάρη πολυμορφισμούς μήκους τμημάτων περιορισμού μετά από πέψη με ενδονουκλεάσες, αποτυπώματα DNA με χρήση μικροδορυφόρων (Benavides et al., 1998), ενίσχυση μικροδορυφόρων μέσω PCR (SSLP), πολυμορφισμοί διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) και ανάλυση αλληλουχίας DNA για τον εντοπισμό διαφόρων SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Οι περισσότερες αν όχι όλες οι τεχνικές βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction ή PCR) (Patrinos et al. 2008).

i. RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms, Πολυμορφισμός Μήκους Τμημάτων Περιορισμού)

Πρόκειται για πολυμορφισμούς οι οποίοι δημιουργούνται από τις τυχαίες νουκλεοτιδικές αλλαγές που μπορεί να συμβούν σε μια περιοχή του DNA, με αποτέλεσμα την καταστροφή της θέσης αναγνώρισης μιας συγκεκριμένης ενδονουκλεάσης περιορισμού (Brock, 2005). Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών που προκύπτουν μετά από πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες υπάρχουν δυο εναλλακτικές μέθοδοι. Η πρώτη μέθοδος είναι η ανάλυση κατά Southern χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή μια αλληλουχία που να περιλαμβάνει τη συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού. Έτσι, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ατόμων στα οποία υπάρχει η θέση αναγνώρισης του ενζύμου από εκείνα στα οποία λόγω κάποιας μετάλλαξης, δεν υπάρχει. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Σε αυτήν την περίπτωση σχεδιάζονται εκκινητές για τις αλληλουχίες που περιβάλλουν τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου και το προϊόν της PCR πέπτεται με τη συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού. Μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αгарόζης, το άτομο στο οποίο η θέση αναγνώρισης έχει καταστραφεί εμφανίζει άθικτο το ενισχυόμενο από την PCR τμήμα. Με τη μέθοδο αυτή καταργούνται πολλά από τα αρχικά μειονεκτήματα διευκολύνοντας τη χρησιμοποίησή των RFLPs στην πληθυσμιακή ανάλυση (Patrinos et al. 2008).

ii) RADPs (Random Amplified polymorphic DNA, Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA)

Με την ανάπτυξη της PCR αναπτύχθηκαν και άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση και την ανάλυση πολυμορφισμών στο νουκλεοτιδικό επίπεδο. Η διαδικασία παραγωγής των RADP βασίζεται στην τυχαία ενίσχυση DNA με PCR. Έτσι είναι δυνατόν να ελεγχθούν πολλές θέσεις του γονιδιώματος ταυτόχρονα όσον αφορά την ύπαρξη πολυμορφικών αλληλουχιών. Το πλεονέκτημα είναι ότι υπάρχουν άφθονοι δείκτες RADP οι οποίοι βρίσκονται τυχαία διασκορπισμένοι στο γονιδίωμα και ότι η ανάλυση γίνεται εύκολα, γρήγορα και με χαμηλό κόστος. Όμως, οι ζώνες που αναπαράγονται δεν μπορούν να αποδοθούν σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα.

iii.AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms, Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων)

Η συγκεκριμένη τεχνική προϋποθέτει την απομόνωση και την πέψη του DNA με κάποιο ένζυμο περιορισμού και στη συνέχεια την προσάρτηση ολιγονουκλεοτιδίων-προσαρμοστών στα τμήματα του DNA που προκύπτουν. Ακολουθεί PCR, με την οποία επιτυγχάνεται επιλεκτική αναπαραγωγή συγκεκριμένων τμημάτων DNA και διαχωρισμός τους με ηλεκτροφόρηση ακρυλαμίδης. Η ανίχνευση των ζωνών που προκύπτουν γίνεται με χρώση με άργυρο ή φθορισμό. Τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα και υπάρχει η δυνατότητα αυτοματισμού. Απαιτούν όμως πολύ καθαρό DNA, μεγάλου μοριακού βάρους. Το πρότυπο του DNA δεν μπορεί να ερμηνευτεί σχετίζοντας αλληλόμορφο και γενετικούς τόπους. Είναι κυρίαρχα αλληλόμορφα, ενώ παρομοίου μεγέθους τμήματα, μπορεί να μην είναι ομόλογα.

iv.SWAPP (Sequencing With Arbitrary Primer Pairs)

Συνδυάζει την τυχαία ενίσχυση DNA με την αλληλούχηση. Αποφεύγει τα προβλήματα επαναληψιμότητας των προηγούμενων μεθόδων, όμως κοστίζει περισσότερο και απαιτεί χρόνο. Η μέθοδος χρησιμοποιεί δύο τυχαίους 10μερείς εκκινητές. Μέσω PCR επιλέγονται οι ζώνες που ενισχύονται παρουσία και των δύο εκκινητών. Ακολουθεί απομόνωση των ζωνών και ανάλυση της αλληλουχίας τους.

v.SSCPs (Single Strand Conformation Polymorphisms, Πολυμορφισμός Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA)

Η ανάλυση του πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) καθιερώθηκε από τους Orita και συνεργάτες (1989) ως μια απλή, αποδοτική και

αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση πολυμορφισμών στην αλληλουχία γονιδιακών τόπων. Η ανάλυση SSCP βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και αναπτύχθηκε σύντομα μετά την παρουσία της τεχνολογίας PCR. Βασίζεται στο γεγονός ότι η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων μονόκλωνου DNA με σχετικά μικρό μήκος, διαμέσου μη αποδιατακτικών πηκτωμάτων, εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους, αλλά και από την αλληλουχία τους. Με βάση τις αρχές αυτές, είναι σαφές ότι διαφορά έστω και σε μια μόνο βάση αρκεί ώστε αυτά να αποκτήσουν διαφορετική διαμόρφωση και συνεπώς να μετακινηθούν σε διαφορετική θέση κατά την ηλεκτροφόρηση (Patrinos et al. 2008).

vi.SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphisms)

Η χρήση μικροδορυφορικών δεικτών είναι πολύ δημοφιλής λόγω της εξαιρετικά εύκολης ανάλυσής τους με χαμηλό κόστος. Η τεχνική συνίσταται στην ενίσχυση μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, συνήθως δινουκλεοτιδίων με τη χρήση παρακείμενων εκκινήτων. Η εξέταση αυτών των δεικτών έφερε πραγματική επανάσταση, γιατί είναι εξαιρετικά απλή, οικονομική και αξιόπιστη. Ένα μειονέκτημα της εξέτασης αυτής –πιθανώς το μοναδικό- είναι η εμφάνιση SNP ή μεταλλάξεων στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες (Patrinos et al. 2008).

vii. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms, Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου)

Πρόκειται για μια μέθοδο που προϋποθέτει γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος. Αφορά αλλαγές σε μια βάση του DNA, οι οποίες αν συμβούν στην περιοχή αναγνώρισης μιας ενδονουκλεάσης περιορισμού αποτελεί παράλληλα και ένα RFLP. Τέτοιου είδους πολυμορφισμοί είναι συνεπώς αναμενόμενο να αφθονούν στο γονιδίωμα κάθε οργανισμού. Η ανάλυση των συγκεκριμένων δεικτών βασίζεται στην υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων με την αλληλουχία στόχο. Αλλαγές έστω και σε μια βάση εμποδίζουν την υβριδοποίηση, κάτι που μπορεί να ανιχνευτεί με διάφορες μεθόδους, π.χ. χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες DNA. Τα SNPs έχουν το μειονέκτημα ότι παρουσιάζουν μόνο δυο αλληλόμορφα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ *L.europaeus*

Βασίλειο:	Ζώων
Φύλο:	Χορδωτά
Υπο-φύλο:	Σπονδυλωτά
Κλάση:	Θηλαστικά
Τάξη:	Λαγόμορφα
Οικογένεια:	<i>Leporidae</i>
Γένος:	<i>Lepus</i>
Είδος:	<i>Europaeus</i>

2.2.Μορφολογία

Ο *Lepus europaeus* είναι μικρό θηλαστικό. Στην επάνω σιαγόνα έχει 4 κοπτήρες, δύο σχετικά μεγάλους και δύο πιο μικρούς. Το μήκος του σώματός του φτάνει τα 70 περίπου εκατοστά ενώ το βάρος του σπάνια ξεπερνά τα 6 κιλά. Χαρακτηριστικό του λαγού είναι η ανισομερής ανάπτυξη του σώματός του. Το μπροστινό τμήμα είναι λιγότερο αναπτυγμένο και τα μπροστινά του πόδια, σε σχέση με τα πίσω, μοιάζουν σαν ατροφικά, γεγονός που επιτρέπει στο λαγό να τρέχει πολύ γρήγορα. Άλλωστε τα πίσω πόδια, που τελικά στηρίζουν το σώμα του και του δίνουν την κίνηση, είναι δυσανάλογα μακριά, σε σχέση με το σώμα του και πολύ δυνατά. Αυτό του επιτρέπει να κάνει μεγάλα πηδήματα και να καταφέρνει, έτσι, να ξεφεύγει από τους εχθρούς του. Το χρώμα του είναι ανάλογο της ηλικίας του. Γενικώς έχει χρώμα καστανοκίτρινο στο πάνω μέρος, προς τα πίσω λευκό, ενώ παρουσιάζει διάφορες παραλλαγές, σκούρους, λευκούς, ανοιχτόχρωμους κ.λ.π. αναλόγως του περιβάλλοντος που ζει. Τα αυτιά των λαγών είναι μεγάλα και όρθια και έχουν την ικανότητα να κινούνται προς όλες τις κατευθύνσεις εξασφαλίζοντάς τους μεγάλη δυνατότητα ακοής. Το κεφάλι τους είναι σχετικό μικρό και σφαιρικό. Δεν έχει παρατηρηθεί διμορφισμός ανάμεσα στα δύο φύλα, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους μόνο ως προς το γεγονός ότι τα αρσενικά έχουν συνήθως πιο κοντό και παχύ λαιμό (Bansfield et al. 1974). Το χειμώνα ο *Lepus europaeus* δεν αλλάζει το τρίχωμά του σε

άσπρο, αποκτά όμως συχνά μια ελαφρώς πιο γκρίζα απόχρωση. Η διάρκεια ζωής του φτάνει τα 7-8 χρόνια (Bansfield et al. 1974).

2.3. Προέλευση και εξάπλωση του είδους

Ο *Lepus europaeus* προήλθε αρχικά από την Ευρασία και έχει πλέον προσαρμοστεί άριστα σε πολλές χώρες ανά τον κόσμο. Σήμερα συναντάται σε όλη την Ευρώπη, Μ. Ασία, Αραβία, Βόρεια Αφρική ενώ έχει επίσης εισαχθεί στην Αμερική, Αυστραλία και στη Νέα Ζηλανδία. Λόγω της μεγάλης του εξάπλωσης, το είδος μπορεί να παρουσιάζει κάποιες μικρές διαφορές από τόπο σε τόπο. Για παράδειγμα στη νότια Ευρώπη ο *L. europaeus* έχει μικρότερο μέσο μέγεθος σώματος και κοντότερο τρίχωμα από τους *L. europaeus* της βόρειας Ευρώπης (Lincoln et al. 1974, Poli et al. 1991).

2.4. Διατροφικές συνήθειες

Ο *Lepus europaeus* είναι χορτοφάγος και πολύ εκλεκτικός στην επιλογή της τροφής του. Οι περιοχές τροφοληψίας αλλάζουν ανάλογα με τη βλάστηση που διαθέτουν τα χωράφια μέχρι να οργωθούν. Έτσι οι αγροτικές περιοχές αξιοποιούνται διαφορετικά ανάλογα με την εποχή του έτους, το είδος και το στάδιο της βλάστησης. Η περιοχή στην οποία κινείται ένας λαγός ποικίλει από 200 έως 1000 στρέμματα. Η προτίμησή του σε ανοίγματα του δάσους, σε θαμνότοπους και φυσικούς φράχτες εξαρτάται από την κλίση του εδάφους, την ποιότητα και ποσότητα της πυκνής φυσικής βλάστησης και την δυνατότητα που δίνεται στο ζώο να διαφύγει από τους διώκτες του. Οι πολύωρες νυχτερινές μετακινήσεις του, τον οδηγούν να τρώει φύτρες ποοειδών ή ψυχανθών, κονδύλους, φρούτα ή μπουμπούκια, λαχανικά όπως τα λάχανα, καρότα, φύλλα από καρπούς δημητριακών. Το χειμώνα τρώει φύλλα θάμνων, φλοιούς ή βλαστάρια νεαρών κωνοφόρων και συχνά καταναλώνει μαλακές κουτσουλιές πουλιών που είναι πλούσιες σε βιταμίνες, αμινοξέα και βακτήρια τα οποία του είναι απαραίτητα (Bansfield et al. 1974, Hamilton et al. 1943).

2.5. Κίνδυνοι και Απειλές

Ο *Lepus europaeus* παραμένει πάντα κοντά στα όρια του δάσους ή στα πλάγια από αλέες, πάντα σε τέτοια θέση που να αντιλαμβάνεται τον παραμικρό τυχόν κίνδυνο που πλησιάζει. Όταν ο καιρός χαλάσει, τον βρίσκουμε σε καθαρά, χέρσα

μέρη ή φρεσκοκαλλιεργημένα χωράφια όπου καταφεύγει και με τις παγωνιές. Ο λαγός υπολογίζει περισσότερο στο μιμητικό του περιβάλλοντος τρίχωμά του, παρά στην φυγή του για να γλιτώσει από τον κίνδυνο. Έτσι, σε πλήρη ανάπτυξη δύσκολα γίνεται αντιληπτός μέσα στο φυσικό περιβάλλον του. Όταν υποχρεώνεται να διασχίσει μία επιφάνεια ακάλυπτη τρέχει ευθεία και γρήγορα για να καταφύγει στο πιο κοντινή πυκνή καλλιέργεια. Η ακοή του είναι φοβερά ισχυρή και αντιλαμβάνεται σχεδόν τα πάντα που συμβαίνουν γύρω του. Επίσης, η κατασκευή των πίσω ποδιών του, δίνει στο λαγό φοβερή δύναμη προώθησης ειδικά στην ανηφόρα και υπό κανονικές συνθήκες δεν υπάρχει κυνηγός δίποδος ή τετράποδος να τον προλαβαίνει σε ταχύτητα σε ανηφορικά μέρη. Γι' αυτό εξ άλλου όταν αποφασίσει να τρέξει, τρέχει πάντα προς τα επάνω. Εχθροί του είναι όλα σχεδόν τα μεγάλα αρπακτικά, τα φίδια, ο αετός και τα μεγάλα γεράκια, όπως το κουνάβι, αλεπού κλπ και βεβαίως ο άνθρωπος.

Ο *Lepus europaeus* αποτελεί θήραμα πολλών αρπακτικών και για αυτό θεωρείται αρκετά σημαντικός οικολογικός παράγοντας σταθερότητας του οικοσυστήματος. Ο λαγός αμύνεται τρέχοντας, χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα ταχύτατους ελιγμούς για να μπερδέψει το θηρευτή του ή μένοντας κρυμμένος στο έδαφος. Ο πληθυσμός του παρουσιάζει κατά καιρούς έντονες και ακανόνιστες αυξομειώσεις που μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες όπως η ποσότητα και ποιότητα της διαθέσιμης τροφής, οι κλιματικοί παράγοντες, καθώς και ο μεγάλος αριθμός των ατόμων του πληθυσμού και ο ανταγωνισμός στην εξεύρεση τροφής. Οι παραπάνω λόγοι έχουν σαν αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού της αναπαραγωγής των *L. europaeus* και την ελάττωση της αντοχής τους σε ασθένειες (Smith et al. 2008).

2.6. Αναπαραγωγή

Το αρσενικό είναι πολυγαμικό. Το ένστικτο αναπαραγωγής είναι τόσο μεγάλο που τους αναγκάζει να διατρέχουν τεράστιες αποστάσεις για εξεύρεση συντρόφου. Δίνονται μεγάλες μάχες μεταξύ των αρσενικών. οι οποίες είναι τόσο, θορυβώδεις και δυνατές που πολλές φορές τα ζώα τραυματίζονται σοβαρά, τυφλώνονται κλπ. Το κυρίαρχο αρσενικό που θα επικρατήσει θα ζευγαρώσει με το θηλυκό. Η εγκυμοσύνη του λαγού διαρκεί περίπου 30 ημέρες, γεννά δε μέχρι και τέσσερις φορές τον χρόνο, πρώτη φορά τον Μάρτιο και τελευταία τον Αύγουστο. Κατά τον πρώτο τοκετό γεννά 1-3 μικρά και κατόπιν 3-4, μετά 3 και τέλος 1-2. Τα μικρά έρχονται στον κόσμο με ανοικτά τα μάτια και είναι πολύ καλά αναπτυγμένα. Μπορούν να κινηθούν και να βαδίσουν άνετα αμέσως, ένα εξελικτικό

χαρακτηριστικό που προέκυψε σχετικά πρόσφατα στην ιστορία του είδους και δεν συναντάται σε συγγενικά είδη όπως π.χ. στα νεογέννητα κουνέλια (Roellig et al. 2010). Θηλάζουν από την μητέρα για μερικές μέρες και αμέσως μετά εγκαταλείπονται στην τύχη τους. Τα μικρά αρχικά ζουν όλα μαζί και βγαίνουν όλα προς αναζήτηση της τροφής την νύχτα. Μετά περίπου από 15 μήνες αυτά είναι τελείως αναπτυγμένα πια, μπορούν δε να αναπαραχθούν από τον πρώτο χρόνο .

2.7. Βιότοπος

Ο *Lepus europaeus* υπάρχει σχεδόν παντού και σε όλον τον κόσμο. Βέβαια είναι βασικά ένα ζώο των πεδιάδων, τον βρίσκουμε όμως και σε βουνά σε μεγάλο υψόμετρο. Συνήθως βρίσκεται σε ξηρά, υγιή και αεριζόμενα εδάφη, όπως μεγάλα δάση δίπλα σε πεδιάδες, παράκτιες περιοχές με καλλιέργειες κλπ. Ο λαγός διαθέτει μια ζωτική περιοχή 300 στρεμμάτων περίπου που την μοιράζεται με τους ομοφύλους του. Στο χώρο αυτό υπάρχουν και διαδρομές διαφυγής, ενώ ο χώρος που συχνάζει είναι 10-15 στρέμματα. Η φωλιά του βρίσκεται σε κοιλώματα, τρύπες, σε ψηλά χόρτα ή θάμνους, καλά καμουφλαρισμένη. Δεν τη διαμορφώνει ο ίδιος, όπως για παράδειγμα το συγγενικό του κουνέλι, αλλά την αναζητά σε φυσικά προστατευμένα σημεία (Bansfield et al. 1974).

2.8. Παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά

Ο *Lepus europaeus* κινείται κυρίως κατά τη διάρκεια της νύχτας, ως γνήσιο νυκτόβιο. Ωστόσο κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού που η νύχτα είναι σχετικά μικρή, ο λαγός επεκτείνει τις δραστηριότητές του και κατά τη διάρκεια των πρώτων και τελευταίων ωρών της ημέρας. Αυτοί που παρατηρούνται την υπόλοιπη ημέρα είναι προφανώς τα άτομα που έχουν ενοχληθεί από κάποιο εχθρό. Οι λαγοί που ζουν σε αγροτικές περιοχές επιλέγουν να ξεκουράζονται σε σημεία που έχουν καλή ορατότητα έχοντας πίσω τους ή στο πλάι έναν θάμνο ή μια μεγάλη πέτρα. Αν όμως υπάρχει αρκετά ψηλό χόρτο τότε το μόνο που κάνουν είναι να κάθονται κάτω διαμορφώνοντας μια μικρή κοιλότητα στη βλάστηση και να παραμένουν ακίνητοι. Αν όμως η βλάστηση είναι σχετικά χαμηλή ή ο καιρός είναι κρύος τότε σκάβει ένα μικρό λάκκο και βυθίζει το πίσω μέρος του σώματός του ώστε να κρύβεται και να προστατεύεται ταυτόχρονα από το κρύο. Η συνήθειά του αυτή τον κάνει αόρατο τις περισσότερες φορές. Ακόμα και σε έναν αγρό με χειμερινό σιτάρι λίγων εκατοστών ύψους διακρίνεται με πολύ μεγάλη δυσκολία. Όταν ο ήλιος βασιλέψει και δεν υπάρχει καμιά ενόχληση εγκαταλείπει την κρυψώνα του και τρέχει γρήγορα ψάχνοντας για τροφή. Νωρίς το πρωί επιστρέφει σε μια από τις κρυψώνες του για να

ξεκουραστεί. Πολλοί λαγοί βέβαια επιλέγουν την άκρη ενός θαμνοτόπου ή δάσους για να κρυφτούν, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Χαρακτηριστικό του γνώρισμα είναι η μεγάλη ταχύτητα που αναπτύσσει, η οποία μπορεί να φτάσει τα 70 χιλιόμετρα την ώρα. Ο λαγός είναι συνεχώς σε εγρήγορση. Όταν ακούσει θόρυβο στέκεται στα πίσω πόδια για να έχει καλύτερη εποπτεία του χώρου, με σηκωμένα τα χαρακτηριστικά μακριά αυτιά του (Hamilton et al. 1943).

2.9. Οικονομική και ερευνητική σημασία του *Lepus europaeus*

Το είδος *Lepus europaeus* ήταν ανέκαθεν θηρεύσιμο είδος. Το κρέας του είναι αρκετά νόστιμο και εξαιρετικής ποιότητας (Bansfield 1974, Hamilton 1943). Σε πολλές όμως περιοχές όπως είναι για παράδειγμα η Αργεντινή, η Αυστραλία και η Νότια Αμερική, ο *Lepus europaeus* εκτός από θηρεύσιμο είδος θεωρείται και ιδιαίτερα ζημιογόνο, εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού αναπαραγωγής του και των καταστροφών που προκαλεί στις γεωργικές καλλιέργειες στην προσπάθειά του να τραφεί (Campbell et al. 2006). Ο *Lepus europaeus*, αν και αποτελεί κυρίαρχο στοιχείο της πανίδας των ανοικτών εκτάσεων με ιδιαίτερη οικονομική σημασία, δεν έχει μελετηθεί εκτενώς ως προς τη βιολογία του, τη φυλογεωγραφική και την πληθυσμιακή του δομή. Η έλλειψη ολοκληρωμένων μελετών του είδους, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μια τέτοια προσπάθεια ενέχει ορισμένες από τις πιο σημαντικές προκλήσεις στο χώρο της θεωρητικής πληθυσμιακής γενετικής, καθιστούν τη μελέτη ευρωπαϊκού λαγού εξαιρετικής σημασίας με ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον. Ο ευρωπαϊκός λαγός, αποτελεί ένα είδος με συνεχή κατανομή που συναντάται σε ποικίλα ενδιαιτήματα, καλύπτοντας τους πόλους της ενδιαιτηματικής ποικιλότητας. Ως είδος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ικανότητα διασποράς με έντονη φιλοπατρική συμπεριφορά (κυρίως από τα θηλυκά άτομα), στοιχεία που συνιστούν μηχανισμούς οι οποίοι μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της πληθυσμιακής δομής ενός είδους (Αντωνίου 2008).

2.10. Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής στο είδος *L. europaeus* σε Ευρώπη και Ασία

Μελέτες πληθυσμιακής γενετικής στο είδος του *Lepus europaeus* που έχουν βασιστεί σε δείκτες πυρηνικού DNA έχουν δείξει αρκετά μεγάλη γονιδιακή ροή ανάμεσα σε μεγάλο εύρος περιοχών (Mamuris et al. 2002, Fickel et al. 1999). Ακόμη

και αναλύσεις βασισμένες σε μικροδορυφόρους, οι οποίοι παρουσιάζουν γρήγορους εξελικτικούς ρυθμούς και απεικονίζουν καλύτερα την πληθυσμιακή γενετική διαφοροποίηση, έχουν αποκαλύψει κοινά αλληλόμορφα μεταξύ ελληνικών, βουλγαρικών και ανατολικών πληθυσμών του *L. europaeus* (Slimen et al. 2008). Από την άλλη πλευρά, αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA έδειξαν ένα μεγαλύτερο βαθμό τοπολογικού διαχωρισμού (Stamatis et al. 2008, Kasapidis et al. 2005). Η παρατηρούμενη αυτή ασυμφωνία μεταξύ πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος αποδόθηκε στην αυξημένη εξάπλωση των αρσενικών ατόμων και στην πιο φιλοπατρική συμπεριφορά των θηλυκών ατόμων του είδους (Mamuris et al. 2009).

Σε μια μεγάλη φυλεογεωγραφική ανάλυση που βασίστηκε σε περίπου 1000 άτομα του είδους από Ευρώπη και Ασία, ταυτοποιήθηκαν πέντε μεγάλοι απλότυποι με καθαρό φυλεογεωγραφικό σήμα, το οποίο αντικατόπτριζε σαφώς την παρουσία των καταφυγίων της πανίδας στα κεντρικά - ανατολικά Βαλκάνια και στην Ανατολή κατά το τέλος περίπου της Γλειςτοκένου εποχής. Αυτή η μελέτη ανίχνευσε την παρουσία δύο καλά διαχωρισμένων απλοτύπων mtDNA ανάμεσα σε Ευρώπη και Ανατολή καθώς και την παρουσία τριών διακριτών mtDNA υπο-κλάδων μέσα στην Ευρώπη (Stamatis et al. 2009).

Διάφορες μελέτες μιτοχονδριακού DNA (Awadalla et al. 1999), έδειξαν μετά την παγετωνική περίοδο αποικισμούς μεγάλων περιοχών στην Ευρώπη, οι οποίοι άρχισαν από ένα μόνο αρχικό πληθυσμό στα νότια - κεντρικά Βαλκάνια. Γενικά οι πληθυσμοί που προήλθαν από αυτά τα καταφύγια της Πλειστόκενου εποχής είναι πιθανό να έχουν δεχτεί μια μείωση στη γενετική ποικιλομορφία που εμφανίζουν, ως αποτέλεσμα του φαινομένου της αρχής του ιδρυτή. Για το *Lepus europaeus*, η επίδραση αυτή έχει δείχθει τόσο μέσα από αναλύσεις του μιτοχονδριακού DNA όσο μέσα και από αναλύσεις αλλοενζύμων οι οποίες δείχνουν μειωμένη γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα σε πληθυσμούς των Βαλκανίων και της Ανατολής (Sert et al. 2005, Taberlet et al. 1998).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. Μιτοχόνδρια και μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

3.1 Βιολογία και Προέλευση

Τα μιτοχόνδρια κατέχουν κεντρική θέση στη βιολογία των κυττάρων και είναι απαραίτητα για την ύπαρξη ζωής. Τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν πολλά μιτοχόνδρια, τα οποία περιέχουν πολλά αντίγραφα μορίων mtDNA. Τα οργανίδια αυτά αποτελούν συνήθως το ~20% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου του ευκαρυωτικού κυττάρου και ο αριθμός τους κυμαίνεται από 1.700 στο ήπαρ και 10.000 στη γιγάντια αμοιβάδα *Chaos chaos* μέχρι 10.000.000 στα ωοκύτταρα αμφιβίων. Το σχήμα τους δεν είναι σταθερό (συνήθως είναι επίμηκες αλαντοειδές ή σκωληκόμορφο) και οι διαστάσεις τους είναι 0.3-1 μm σε διάμετρο με 1-10 μm σε μήκος. Περιέχουν 66% νερό, 22% πρωτεΐνες, 11% λιπίδια και 1% νουκλεοτίδια και ιόντα.

Σχετικά με την προέλευση του μιτοχονδρίου η πλέον αποδεκτή θεωρία είναι η «θεωρία ενδοσυμβίωσης», κατά την οποία το γονιδίωμα των μιτοχονδρίων έχει εξωγενή προέλευση, και συγκεκριμένα προέρχονται από βακτηριακούς προγόνους οι οποίοι εισέβαλαν σε πρωτο-ευκαρυωτικά κύτταρα (Margulis, 1981).

Η δομή τους είναι χαρακτηριστική: αποτελούνται από μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική που σχηματίζει πολυάριθμες πτυχώσεις (ή ακρολοφίες). Η εξωτερική μεμβράνη αποκαλύπτει κρυσταλλική κατανομή των συστατικών της, ενώ η εσωτερική μεμβράνη περικλείει μια κοκκιώδη περιοχή (μιτοχονδριακή μήτρα). Οι δύο μεμβράνες έχουν διαφορετική σύσταση σε λιπίδια και πρωτεΐνες: η εξωτερική περιέχει 52% λιπίδια και 48% πρωτεΐνες, ενώ η εσωτερική περιέχει 24% λιπίδια και 76% πρωτεΐνες.

Η μορφολογία αυτών των οργανιδίων και ιδιαίτερα η κατανομή των πτυχώσεων φαίνεται να έχει σχέση με την έκταση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που επιτελείται, αφού ο αριθμός των πτυχώσεων αυξάνει καθώς αυξάνει ο ρυθμός οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

Όσον αφορά τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, τα συγκεκριμένα οργανίδια είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP). Θεωρούνται ως τα σημαντικότερα οργανίδια στην όλη διαδικασία παραγωγής

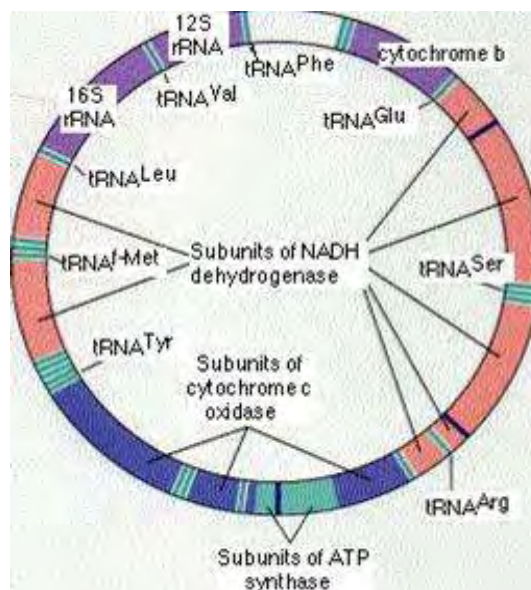
ενέργειας στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το καθαρό ενεργειακό κέρδος είναι περίπου 30 μόρια ATP δεδομένης της ενεργειακής απώλειας για τη μεταφορά των μορίων ATP από το μιτοχόνδριο στο κυτταρόπλασμα.

Η μιτοχονδριακή μήτρα περιλαμβάνει πολλά και ετερογενή συστατικά, όπως ένζυμα του κύκλου του *Krebs* (κιτρική συνθετάση, ισοκιτρική αφυδρογονάση, φουμαράση, μαλαϊκή αφυδρογονάση), γλουταμινική αφυδρογονάση, ένζυμα οξείδωσης λιπαρών οξέων και ακόμα DNA, RNA και ριβοσώματα. Στη μιτοχονδριακή μήτρα γίνεται η οξείδωση των λιπαρών οξέων.

Τέλος, ο καθοριστικός ρόλος αυτών των οργανιδίων φαίνεται και από το γεγονός ότι τα οργανίδια αυτά παίζουν κεντρικό ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης στους μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς. Στον μηχανισμό αυτό απελευθερώνονται από το μιτοχόνδριο παράγοντες απόπτωσης, όπως είναι το κυτόχρωμα c, που ενεργοποιεί το βιοχημικό μονοπάτι που ελέγχει την παραγωγή κασπάσης, και τον παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (AIF), που εμπλέκεται στον εξαρτώμενο από κασπάση κυτταρικό θάνατο. (Μαργαρίτης, 2004).

3.2. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Το μιτοχονδριακό DNA των ζώων είναι ένα κυκλικό μόριο, μεγέθους 15-20 kb συνήθως, και περιλαμβάνει 37 γονίδια. Το τυπικό μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών αποτελείται από μία μη κωδικοποιούσα ρυθμιστική περιοχή, 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, δύο ριβοσωμικά RNA (rRNA) και 22 μεταφορικά RNA (tRNA)(εικόνα 1). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από το μιτοχόνδριο είναι οι επτά υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH, μια υπομονάδα του κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c και δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 8)



Εικόνα 1: Το μιτοχονδριακό DNA. (users.rcn.com/.../C/CellularRespiration.html)

Όπως προαναφέρθηκε, έχειδειχθεί πως το μιτοχονδριακό DNA έχει διαφορετική εξελικτική προέλευση από το πυρηνικό DNA αφού η θεωρία της ενδοσυμβίωσης υποστηρίζει τη βακτηριακή προέλευση του μιτοχονδρίου. Έτσι, το μιτοχονδριακό DNA προέρχεται από τα κυκλικά γονιδιώματα των βακτηρίων που εισχώρησαν και συγχωνεύτηκαν με τα πρωτόγονα ευκαρυωτικά κύτταρα (Gould et al. 2008). Μια ακόμη συνέπεια της βακτηριακής προέλευσης του μιτοχονδρίου είναι ότι τα γονιδιώματα των οργανιδίων αντιγράφονται και κληρονομούνται με διαφορετικό τρόπο απ' ότi τα γονίδια του πυρήνα.

Στους περισσότερους πολυκύτταρους οργανισμούς, το mtDNA κληρονομείται μόνο από τα θηλυκά άτομα στους απογόνους τους, ανεξάρτητα από το φύλο τους. Το DNA του σπερματοζωαρίου στο ωοκύτταρο, όπου σχηματίζει τον αρσενικό προπυρήνα. Κατά την είσοδο του όμως, το σπερματοζωάριο δε συνεισφέρει μιτοχονδριακό DNA στο ζυγωτό αλλά αυτό παρέχεται αποκλειστικά από το κυτταρόπλασμα του γονιμοποιημένου ωοκυττάρου.

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα αποτελεί χρήσιμη πηγή γενετικής πληροφορίας για επιστημονικές έρευνες πληθυσμιακής γενετικής και εξελικτικής βιολογίας λόγω της σχεδόν πλήρους απουσίας γενετικού ανασυνδυασμού (Awadalla et al. 1999). Επειδή όλο το μιτοχονδριακό DNA κληρονομείται σαν μία μονάδα, οι σχέσεις μεταξύ του μιτοχονδριακού DNA από διαφορετικά άτομα μπορεί να παρουσιαστεί με τη μορφή δένδρογράμματος. Ωστόσο, το μιτοχονδριακό DNA αντανakλά μόνο την ιστορία των θηλυκών ατόμων του πληθυσμού και έτσι μπορεί να μην αντιπροσωπεύει

την εξελικτική ιστορία όλου του πληθυσμού. Επομένως θα πρέπει να μελετώνται και τα γονίδια του πυρήνα για αξιόπιστα αποτελέσματα.

3.3 Χρήση του mtDNA στις φυλογενετικές μελέτες

Ο Avise και οι συνεργάτες του (1987), υποστηρίζουν ότι ένα κατάλληλο μοριακό σύστημα για φυλογενετική ανάλυση θα πρέπει να έχει τις εξής ιδιότητες:

- να αποτελεί διακριτό χαρακτήρα, ευρέως κατανεμημένο ώστε να μπορούν να γίνουν συγκρίσεις ομολογίας σε ένα μεγάλο φάσμα οργανισμών,
- να μπορεί να απομονωθεί και να εξεταστεί εύκολα,
- να έχει απλή γενετική δομή χωρίς πολύπλοκα στοιχεία, όπως επαναλαμβανόμενο DNA, μεταθετά στοιχεία, ψευδογονίδια και ιντρόνια,
- να έχει άμεσο τρόπο γενετικής μεταβίβασης, χωρίς ανασυνδυασμό ή άλλες γενετικές αναδιατάξεις,
- να παρέχει μια σειρά καταστάσεων ποιοτικού χαρακτήρα, των οποίων οι φυλογενετικές σχέσεις να μπορούν να συναχθούν με βάση λογικά φειδωλά κριτήρια και
- να εξελίσσεται με ραγδαίο ρυθμό ώστε να εμφανίζονται νέες καταστάσεις χαρακτήρων ακόμα και κατά τη διάρκεια ζωής ενός είδους, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες μικροεξέλιξης.

Το mtDNA των ανώτερων ζώων πληροί σε μεγάλο βαθμό όλα τα προαναφερόμενα κριτήρια. Η εκτεταμένη χρήση των αλληλουχιών του mtDNA στις φυλογενετικές μελέτες, οφείλεται σε διάφορους παράγοντες :

- στο συμπαγές πακετάρισμα των γονιδίων με λίγα μόνο μη μεταφραζόμενα νουκλεοτίδια εντός των γονιδίων,
- στην έλλειψη ανασυνδυασμού
- στην μητρική κυρίως κληρονομικότητα. Υπολογίζεται ότι για τα μιτοχονδριακά γονίδια στα ζώα και τα φυτά ανιχνεύεται πατρικός γενότυπος σπανιότερα του 1-10%
- στην ταχύτερη εξέλιξη των μιτοχονδριακών αλληλουχιών σε σύγκριση με τις πυρηνικές, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε ανεπάρκεια του μηχανισμού επιδιόρθωσης και
- στα πολλαπλά αντίγραφα που υπάρχουν σε ένα κύτταρο.

Το μιτοχονδριακό DNA αποτελεί συνεπώς σημαντικό εργαλείο σε φυλογενετικές μελέτες που γίνονται με την ανάλυση αλληλουχιών. Είναι σημαντικό

ότι διαφορετικές αλληλουχίες mtDNA εξελίσσονται με διαφορετικούς ρυθμούς, έτσι ώστε η εκάστοτε έρευνα να εστιάζεται στις κατάλληλες για την περίπτωση αλληλουχίες. (Wilson et al., 1985).

Η αξία του μιτοχονδριακού DNA σε μελέτες μοριακής οικολογίας και φυλογεωγραφίας είναι ανεκτίμητη. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, υπάρχει η αντίληψη ότι η αναφορά σε ένα μόνο μόριο δεν είναι πολλές φορές ικανοποιητική για την απάντηση σε διάφορα ερωτήματα. Συνεπώς θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνδυαστικά και άλλοι πυρηνικοί δείκτες.

3.3 Το mtDNA ως φυλογενετικός δείκτης

Οι μελέτες στο επίπεδο του mtDNA δείχνουν ότι οι πληθυσμοί ενός είδους παρουσιάζουν μια γεωγραφικά εντοπισμένη γενεαλογική δομή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι φυλογενετικοί κλάδοι, σε ενδοειδικά δενδρογράμματα βάσει mtDNA, να εμφανίζουν μια συγκεκριμένη γεωγραφική οριοθέτηση.

Από την ικανότητα διασποράς του οργανισμού καθώς και από το βαθμό κατάτμησης του περιβάλλοντος στο οποίο αυτός κατοικεί εξαρτάται το πρότυπο της φυλογεωγραφικής δομής του mtDNA. Συνεπώς, οργανισμοί με μικρή ικανότητα μετανάστευσης ή οργανισμοί που ζουν σε απομονωμένα περιβάλλοντα εμφανίζουν μεγάλη γεωγραφική-γενετική διαφοροποίηση. Αντίθετα, οργανισμοί με μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς παρουσιάζουν μικρότερη γενετική διαφοροποίηση.

Οι Avise et al. (1987) συνοψίζοντας τα ευρήματα από τις φυλογεωγραφικές μελέτες διαφόρων ειδών, με χρήση mtDNA, διατύπωσαν τις εξής υποθέσεις :

- Τα περισσότερα είδη κατανέμονται γεωγραφικά σε πληθυσμούς, τα μέλη των οποίων καταλαμβάνουν διαφορετικούς κλάδους ενός ενδοειδικού φυλογενετικού δένδρου.
- Τα είδη των οποίων οι πληθυσμοί εμφανίζουν μη εντοπισμένη φυλογεωγραφική δομή, έχουν βιολογική ιστορία που επιτρέπει τη διασπορά
- Μονοφυλετικές ομάδες που διαχωρίζονται από μεγάλα φυλογενετικά χάσματα, προκύπτουν συνήθως, εξαιτίας μακροχρόνιων εξωγενών βιογεωγραφικών περιορισμών στη γονιδιακή ροή.

3.4 Πολυμορφισμός στο επίπεδο του mtDNA

Μοριακές μελέτες του μιτοχονδριακού γονιδιώματος αποκάλυψαν πολυμορφισμό σε πάρα πολλές θέσεις. Ο βαθμός και το είδος του πολυμορφισμού χρησιμοποιήθηκε για να βρεθεί η φυλογενετική σχέση ανάμεσα σε ζωικά και φυτικά είδη. Με παρόμοια πειράματα αποδείχτηκε ότι μπορεί να γίνει ή έγινε στο παρελθόν ροή γονιδίων μιτοχονδριακού γονιδιώματος ενός είδους σε άλλο είδος, π.χ. ανάμεσα στα είδη *Drosophila pseudoobscura* και *D. persimilis* και *Mus musculus* και *M. m. domesticus*.

Η μελέτη του mtDNA έδειξε ότι εξελίσσεται ταχύτερα από το πυρηνικό DNA, με ρυθμό μεταλλαξιγένεσης περίπου 10πλάσιο από το πυρηνικό. Επομένως αναμένεται ότι θα υπάρχει μεγάλη απόκλιση ανάμεσα στις αλληλουχίες DNA των διάφορων πληθυσμών του ανθρώπου. Ο Wilson και οι συνεργάτες (έτος) μελέτησαν τον πολυμορφισμό του μιτοχονδριακού DNA, όπως αποκαλύπτεται από 12 ένζυμα περιορισμού, σε 147 άτομα που προέρχονταν από την Αφρική, την Ασία, την Αυστραλία, την Ευρώπη και τη Ν. Γουινέα. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια όλων των πληθυσμών, εκτός της Αφρικής, έχουν πολλαπλή προέλευση. Αυτό σημαίνει ότι κάθε περιοχή αποικίστηκε πολλές φορές στο παρελθόν. Το βασικό συμπέρασμα της μελέτης είναι ότι το προγονικό και αρχικό DNA προέρχεται από την Αφρική από γυναίκα που έζησε σε αυτή την περιοχή. Από διάφορες εκτιμήσεις καταλήγουν ότι η Εύα έζησε στην Αφρική πριν από 200.000 χρόνια. Τα συμπεράσματα της μελέτης προκάλεσαν πολλές γόνιμες επιστημονικές συζητήσεις και ενεργοποίησαν πειράματα που σκοπό έχουν να ελέγξουν την ορθότητα αυτών των συμπερασμάτων (Τριανταφυλλίδης, 1992).

3.5 Μελέτες των πολυμορφισμών στα γονίδια *ATP6* και *NADH2* σε διάφορους οργανισμούς

Με εφαρμογή της μεθόδου RFLP (Lovette et al. 1999) σε πτηνά του είδους *Dendroica*, για την ταξινόμηση των υπερ-ειδών *D.occidentalis*, *D.townsendi*, *D.virens* και *D.nigrescens*, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες πολυμορφισμών του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υπομονάδα 6 της μιτοχονδριακής συνθάσης ATP. Επίσης στο γένος *Drosophila* έχει δειχθεί ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό μη συνώνυμων μεταλλάξεων στο γονίδιο *ATP6* της *D.melanogaster* σε σχέση με τα στενά συγγενικά της είδη *D.simulans*, *D.mauritiana* και *D.yakuba* (Kaneko et al. 1993).

Όσον αφορά πολυμορφισμούς του γονιδίου *NADH2* το οποίο κωδικοποιεί την υπομονάδα 2 της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q, αυτοί έχουν μελετηθεί σε διαφορετικά είδη από σαλαμάνδρες (Weisrock et al. 2005), σε ταξινόμηση ειδών ακριδών (Litzenberger et al. 2001), σε πτηνά του γένους *Icterus* (Omland et al. 1999) και σε αιλουροειδή του γένους *Panthera* (Yu et al. 2005). Τέλος, μια συγκριτική μελέτη ανάμεσα σε άνθρωπο και χιμπατζή βασίστηκε στον εντοπισμό πολυμορφισμών του γονιδίου *NADH2* με σκοπό να διαπιστωθεί αν οι πολυμορφισμοί αυτοί ακολουθούν ένα ουδέτερο πρότυπο μοριακής εξέλιξης (Wise et al. 1998).

3.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η εύρεση, με τη βοήθεια των τεχνικών PCR-SSCP του επιπέδου της γενετικής ποικιλομορφίας ανάμεσα σε πληθυσμούς του *Lepus Europaeus*. Πιο συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια εντοπισμού γενετικών πολυμορφισμών σε δύο τμήματα γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA τα οποία κωδικοποιούν για δύο υπομονάδες μιτοχονδριακών ενζύμων: την υπομονάδα 6 της ATP συνθάσης (γονίδιο *ATP6*) και την υπομονάδα 2 της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (γονίδιο *NADH2*). Τα δύο αυτά ένζυμα επιτελούν σημαντικότερες λειτουργίες στο μονοπάτι της παραγωγής ενέργειας με τη μορφή ATP και μέσω αυτού μπορούν να εμπλέκονται στη γονιμότητα των αρσενικών ατόμων. Μελετήθηκαν δείγματα από τέσσερα νησιά του Αιγαίου (Σάμο, Μυτιλήνη, Χίο, Ρόδο) και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με προηγούμενες μελέτες που εξέτασαν την ύπαρξη πολυμορφισμού στο ίδιο είδος σε περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας, της Ευρώπης και της Ασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο κεφαλαίο αυτό αναφέρεται αναλυτικά ο εξοπλισμός (υλικά, συσκευές, αντιδραστήρια) ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους της εργασίας καθώς και η πειραματική πορεία της κάθε μεθόδου.

4.1 ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης

➤ Αντιδραστήρια

1. Αγαρόζη
2. TAE 1X: Παρασκευάζεται με αραιώση πυκνού διαλύματος TAE 50X (20 ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την παρασκευή του TBE 50X (500ml) χρησιμοποιήθηκαν: 121g Tris base, 28,5 ml οξικού οξέος, 50ml αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ ή απλά EDTA 0,5M και ddH₂O έως τελικό όγκο 500ml.
3. Βρωμιούχο αιθίδιο
4. Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer). Για την παρασκευή loading buffer 6X (10ml) χρησιμοποιήθηκαν: 1ml μπλε της βρωμοφαινόλης 1% w/v, 0,5 TBE 20X, 5ml γλυκερόλη και ddH₂O έως τελικό όγκο 10ml.

➤ Υλικά

1. Κωνική φιάλη Ογκομετρικός κύλινδρος Πιπέτες ακριβείας

➤ Συσκευές

1. Συσκευή παρασκευής της πηκτής αγαρόζης.
2. Φούρνος μικροκυμάτων
3. Συσκευή παροχής υπεριώδους ακτινοβολίας
4. Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
5. Τροφοδοτικό μηχανήμα

B. Εξοπλισμός για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

➤ Αντιδραστήρια

1. Αποστειρωμένο ddH₂O

2. Ρυθμιστικό διάλυμα
3. Χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$)
4. Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
5. Εκκινητές (primers)
6. *Taq* DNA πολυμεράση
 - Υλικά
1. Πιπέτες ακριβείας
2. Φιαλίδια erppendorf Στατώ
 - Συσκευές
1. Φυγόκεντρος
2. Θερμικοί κυκλοποιητές

Γ. Εξοπλισμός για την ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πηκτική ακρυλαμίδης (ανάλυση SSCP)

- Αντιδραστήρια
- 1. ddH₂O
- 2. ακρυλαμίδη
- 3. δις-ακρυλαμίδη
- 4. TBE 10X (2lt). Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν: 216 Tris Base, 110g βορικού οξέος, 16,6ml EDTA, ddH₂O έως τελικό όγκο 2lt
- 5. τετραμεθυλεθυλοδιαμίνη (TEMED)
- 6. υπερθειικό αμμώνιο (APS) 20%
- 7. Διάλυμα φόρτωσης. Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν: 95% φορμαμίδιο, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,025% κυανούν της ξυλόλης
- Υλικά
- 1. Ποτήρι ζέσεως
- 2. Μαγνήτης ανάδευσης
- 3. Ογκομετρικοί κύλινδροι
- 4. Χωνί μετάγγισης
- 5. Χαρτί διήθησης
- Συσκευές
- 1. Συσκευή παρασκευής πηκτής ακρυλαμίδης

2. Μαγνητικός αναδευτήρας
3. Συσκευή καθέτης ηλεκτροφόρησης

Δ. Εξοπλισμός για τη χρώση της πηκτής ακρυλαμίδης

➤ Αντιδραστήρια.

1. ddH₂O
2. EtOH 100%
3. οξικό οξύ
4. Νιτρικός άργυρος (AgNO₃)
5. Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH)
6. Βοροϋδρίδιο του νατρίου (NaBH₄)
7. Φορμαλδεϋδη

➤ Υλικά

1. Μεταλλικό δοχείο χρώσης
2. Ογκομετρικοί κύλινδροι
3. Ποτήρι ζέσεως
4. Μαγνήτης ανάδευσης

➤ Συσκευές

1. Συσκευή οριζόντιας κυκλικής ανάδευσης- ανακινούμενη πλάκα
2. Οριζόντιος μαγνητικός αναδευτήρας
3. Συσκευή προβολής πηκτής ακρυλαμίδης

Προγράμματα βιοπληροφορικής

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής **BioEdit**. Για να θεωρηθούν έγκυρες οι αλληλουχίες θα πρέπει να έχουν ίδιο μήκος μεταξύ τους και σε κάθε βάση να αντιστοιχεί μία μοναδική κορυφή του ηλεκτροφορεγραφήματος.. Για την ομοπαράθεση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα **ClustalW** (Thompson 1994). Οι μέθοδοι Clustal χρησιμοποιούν προοδευτικούς αλγορίθμους κατά τους οποίους οι δυο συνολικά πιο ομόλογες αλληλουχίες στοιχίζονται πρώτες και ακολουθεί μια σειρά από νέες στοιχίσεις προσθέτοντας σε κάθε βήμα την αμέσως συγγενέστερη αλληλουχία προς τις ήδη στοιχισμένες. Στη συνέχεια, οι πρότυπες αλληλουχίες των δύο γονιδίων ATP6 και NADH2 επεξεργάστηκαν με το ηλεκτρονικό πρόγραμμα βιοπληροφορικής **MEGA 4.0** (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Με τη χρήση του συγκεκριμένου

προγράμματος, είναι δυνατή η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών, η εύρεση των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων ανάμεσα στους απλότυπους, ο προσδιορισμός των αλλαγών στην αμινοξική αλληλουχία, και η κατασκευή δενδρογράμματος με επιλογή του επιθυμητού μοντέλου (NJ, UPGMA, ML, MP), όπως και ο έλεγχος bootstrap για το κατασκευασμένο δέντρο.

4.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Πρόκειται για την ευκολότερη μέθοδο διαχωρισμού και ελέγχου του DNA. Στηρίζεται στη διαφορετική μετακίνηση των νουκλεϊκών οξέων σε μία πηκτή, ανάλογα του μεγέθους τους. Τα μόρια DNA επειδή είναι αρνητικά φορτισμένα, κινούνται διαμέσου των πόρων της πηκτής υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου προς το θετικό πόλο (εικόνα 2).

Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο για τον έλεγχο της ποιότητας του απομονωμένου DNA και των προϊόντων PCR. Στην πρώτη περίπτωση ελέγχεται η ακεραιότητα του απομονωμένου DNA και γίνεται μία αδρή εκτίμηση για την ποσότητα, η οποία είναι ανάλογη της έντασης της ζώνης που εμφανίζεται. Όσον αφορά το προϊόν PCR, εκτός από την εκτίμηση της ποσότητάς του, πληροφορούμαστε και για το αν υπάρχουν παραπροϊόντα, δηλ. επιπλέον ζώνες.



Εικόνα 2: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

Βήμα 1ο: Η πηκτή κατασκευάστηκε με διάλυση 0,6 gr αгарόζης σε 40 ml TAE IX, μέσα σε γυάλινη κωνική φιάλη. Η αгарόζη διαλύθηκε με θέρμανση σε φούρνο

μικροκυμάτων (600W). Στη συνέχεια, το διάλυμα αφέθηκε για λίγα λεπτά να κρυώσει και προστέθηκαν 3 μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml)

Βήμα 2ο: Ακολούθησε ανάδευση του διαλύματος και τοποθέτησή του στο ειδικό καλούπι με τα χτενάκια. Τα χτενάκια χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των πηγαδιών της πηκτής, των θέσεων δηλαδή στις οποίες τοποθετούνται στη συνέχεια τα δείγματα.

Βήμα 3ο: Για την προετοιμασία των δειγμάτων αναμείχθηκαν 5μl διαλύματος φόρτωσης (1 ml κυανό της βρωμοφαινόλης, 5ml γλυκερόλη 99%, 0.5ml TBE 20X και ddH₂O έως τα 10ml) με 3μl DNA (προϊόν PCR) και τοποθετήθηκαν στα πηγάδια της πηκτής αγαρόζης. Το διάλυμα φόρτωσης είναι ορατό σε φυσικό φως, μετακινείται μαζί με το DNA και εξυπηρετεί ως δείκτης παρακολούθησης του μετώπου της ηλεκτροφόρησης.

Βήμα 4ο: Η πηκτή τοποθετήθηκε στο μηχάνημα ηλεκτροφόρησης μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα TAE IX. έτσι ώστε να καλύπτεται πλήρως.

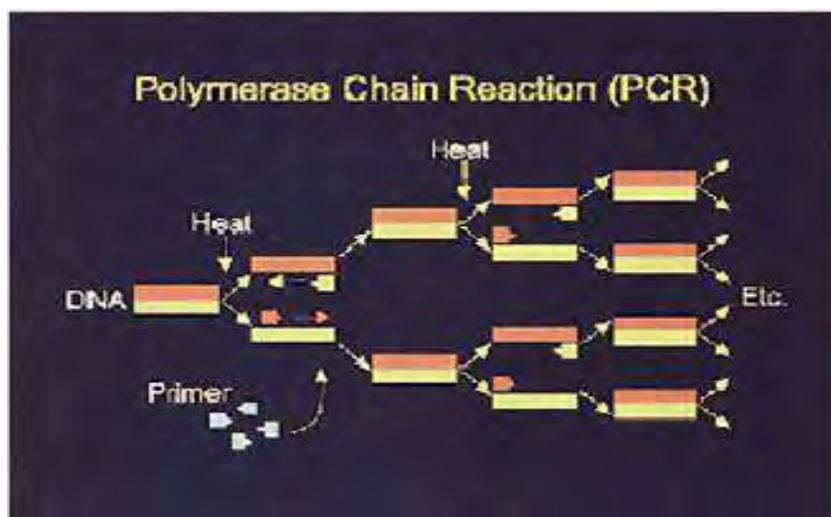
Βήμα 5ο: Ρυθμίστηκε η τάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής στα ~100Volts (180mA) και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν, έως ότου η χρωστική να καλύψει σχεδόν τα 2/3 της απόστασης από το σημείο τοποθέτησης των δειγμάτων.

Βήμα 6ο: Η πηκτή τοποθετήθηκε σε ειδική συσκευή υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας όπου γίνονται ορατές οι ζώνες του DNA. Το γενωμικό DNA της απομόνωσης αναμένεται να βρίσκεται μέσα ή λίγο πιο κάτω από τα πηγάδια της πηκτής (Patrinos et al. 2008, εκδόσεις Παρισιανού).

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, *in vitro*. Σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών, η συγκεκριμένη περιοχή του DNA, πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επαναυβριδοποίησης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος.

Το DNA-στόχος, επεκτείνεται μετά από πολλαπλές αντιγραφές, σε ποσότητα που να είναι ανιχνεύσιμο. Το DNA στόχος αποτελεί το πρότυπο DNA στην PCR και ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτιδια (18-22 βάσεων) τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA.



Εικόνα 3: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η μετουσίωση του DNA στόχου κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο και επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95°C για ~30 sec. Εν συνέχεια υβριδοποιούνται τα δυο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές ή primers) στις δυο πλευρές του DNA-στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA. Η θερμοκρασία εξαρτάται από το ποσοστό των βάσεων A/T, G/C και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 50-65°C. Η διάρκεια αυτού του σταδίου είναι ~1 min. Με τη δράση της *Taq* DNA πολυμεράσης, προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή και ο κλώνος επεκτείνεται. Η επέκταση των εκκινητών γίνεται στους 72-74°C και ο χρόνος εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος της PCR και από την ποιότητα της *Taq* DNA πολυμεράσης. Έτσι σχηματίζονται δυο καινούργιοι κλώνοι DNA συμπληρωματικοί προς τους δυο κλώνους του προτύπου DNA με αποτέλεσμα το διπλασιασμό της ποσότητας του DNA στόχου. Οι κλώνοι που σχηματίζονται χρησιμοποιούνται ως πρότυπο στον επόμενο κύκλο. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ενίσχυση του DNA στόχου κατά 2^n αντιγράφων όπου n ο αριθμός κύκλων. Τέλος, χρησιμοποιείται η φάση της τελικής επιμήκυνσης, η οποία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C για 10 λεπτά μετά τον τελευταίο κύκλο PCR για να διασφαλιστεί ότι τυχόν εναπομείνουσες μονόκλωνες έλικες DNA θα επεκταθούν πλήρως (εικόνα 3).

Όλη η PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται : DNA στόχος, primers, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο *Taq* DNA πολυμεράση, ιόντα Mg^{++} απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα pH 8,2.

Το ενζυμο *Taq* DNA είναι μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση η οποία απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (*Taq*) και έχει την ιδιότητα να είναι ενεργό ακόμη και στους 95°C, θερμοκρασία η οποία απαιτείται για τη μετουσίωση του DNA στόχου. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας ανάμεσα σε κάθε κύκλο επιτυγχάνονται με αυτοματοποιημένες συσκευές, τους θερμοκυκλοποιητές, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αυξομειώνουν τη θερμοκρασία μεταξύ των τριών προαναφερόμενων θερμοκρασιών, σε λιγότερο από 30 sec για αυξομείωση θερμοκρασίας 40°C.

Εκκινητές για την ενίσχυση των γονιδίων *ATP6* και *NADH2*

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *ATP6* και *NADH2* παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Ο εκκινητής forward του γονιδίου *ATP6* υβριδοποιείται με τα νουκλεοτίδια 8132-8153, ενώ ο εκκινητής reverse με τα νουκλεοτίδια 4472-4448. Αντίστοιχα, οι εκκινητές forward και ο reverse του γονιδίου *NADH2* υβριδοποιείται με τα νουκλεοτίδια 8132-8153 και 8582-8560.

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων *ATP6* και *NADH2*

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
<i>ATP6</i>	Forward	TCC CCC AAA GGA CGA ACC TGG G	428 bp
	Reverse	AGG CTT GAA TTA GGG CCA CAG CA	
<i>NADH2</i>	Forward	TAA GGC CAC ACC ACG ATC AAC AGA	395 bp
	Reverse	TGG GCA ATT GAG GAA TAC GCT AGG A	

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

Βήμα 1ο: Προετοιμάζουμε το κύριο μείγμα (mix), το οποίο περιέχει τις ακόλουθες ποσότητες αντιδραστηρίων ανά δείγμα: 37μl αποστειρωμένο ddH₂O, 5μl Buffer 10X, 2μl MgCl₂ (50mM), 1μl dNTPs (10mM), 1μl Primer Fw (50pmol/μl), 1μl Primer Rv (50pmol/μl), 0,2μl *Taq* (5U/μl) DNA πολυμεράση (Bioline).

Βήμα 2ο: Σε κάθε eppendorf προσθέτουμε από 3 μl DNA από το εκάστοτε δείγμα.

Βήμα 3ο: Μοιράζουμε 47μl από το mix, σε κάθε φιαλίδιο eppendorf. Η κάθε αντίδραση έχει τελικό όγκο 50μl.

Βήμα 4ο: Απαραίτητη για την επιβεβαίωση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων είναι η χρήση ενός αρνητικού ελέγχου (negative control). Γι αυτό προσθέτουμε σε

ένα eppendorf ποσότητα από το μείγμα(mix) χωρίς την προσθήκη DNA. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατόν να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμολύνσεων από εξωγενές DNA. Η επιμόλυνση ταυτοποιείται στην περίπτωση που ο αρνητικός έλεγχος δώσει προϊόν στην ηλεκτροφόρηση που πραγματοποιείται σε πηκτή αγαρόζης

Βήμα 5ο: Πραγματοποιούμε μια ταχύτατη φυγοκέντρωση (spin) και όλα τα eppendorfs τοποθετούνται στο μηχάνημα κυκλοποίησης. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την PCR ήταν οι ίδιες και για τα δύο γονιδιακά τμήματα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου της PCR για την ενίσχυση των γονιδίων ATP6 και NADH2.

Στάδιο αντίδρασης	Συνθήκες PCR	
Αρχική αποδιάταξη	95°C	4 min
Αποδιάταξη	95°C	40 sec
Συγκόλληση εκκινητών	52 °C	50 sec
Επιμήκυνση	72 °C	40 sec
Τελική επιμήκυνση	72 °C	10 min
Διατήρηση	4 °C	

Βήμα 6ο: Ελέγχουμε την επιτυχία της PCR κάνοντας ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης.

Βήμα 7ο: Παρατηρούμε την πηκτή σε συσκευή υπεριώδους φωτός .

Ανάλυση Πολυμορφισμού Διαμόρφωσης Μονόκλωνου DNA (Single Strand Polymorphism, SSCP)

Η ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνου DNA (SSCP) καθιερώθηκε από τους Orita και συνεργάτες (1989) ως μια απλή, αποδοτική και αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση αλλαγών στην αλληλουχία γονιδιακών τόπων. Η ανάλυση SSCP βασίζεται στην PCR και αναπτύχθηκε σύντομα μετά την παρουσίαση της τεχνολογίας PCR. Βασίζεται στο γεγονός ότι η ταχύτητα μετακίνησης των τμημάτων μονόκλωνου DNA με σχετικά μικρό μήκος, διάμεσου μη αποδιατακτικών πηκτωμάτων, εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθος τους, αλλά και από την αλληλουχία τους. Έτσι, μετά από ενίσχυση με PCR μιας δεδομένης αλληλουχίας DNA, τα προϊόντα υποβάλλονται σε αποδιάταξη είτε με θέρμανση είτε με χημικούς παράγοντες. Κατόπιν, τα αποδιαταγμένα τμήματα DNA ηλεκτοφορούνται σε μη

αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Κατά την ηλεκτροφόρηση, τα μονόκλωνα τμήματα DNA αποκτούν μία συγκεκριμένη τρισδιάστατη δομή, που εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα εξαρτάται από την τρισδιάστατη διαμόρφωσή τους. Με βάση αυτές τις αρχές, είναι σαφές ότι διαφορά έστω και σε μια μόνο βάση, ανάμεσα στα υπό εξέταση τμήματα DNA, αρκεί ώστε αυτά να αποκτήσουν διαφορετική διαμόρφωση και συνεπώς να μετακινηθούν σε διαφορετική θέση κατά την ηλεκτροφόρηση.

Διάφορες παράμετροι της ανάλυσης SSCP επηρεάζουν τη διαμόρφωση του μονόκλωνου μορίου, η οποία καθορίζει την τελική ηλεκτροφορητική κινητικότητά του. Οι παράμετροι αυτές είναι: Α) το μέγεθος των προϊόντων PCR. Κατά προτίμηση, το μέγεθος του τμήματος DNA πρέπει να είναι μεταξύ 150bp και 350bp. Β) η αποδιάταξη. Είναι σημαντικό να επιτυγχάνεται πλήρης και κατά το δυνατόν, μη ανατρέψιμη αποδιάταξη των κλώνων του DNA και Γ) οι συνθήκες της ηλεκτροφόρησης (η διάρκεια και το μήκος του πηκτώματος, η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος, η θερμοκρασία και η σύσταση του πυκτώματος). Μια άλλη σημαντική παράμετρος της ανάλυσης SSCP είναι η ανίχνευση των μονόκλωνων τμημάτων DNA, για την οποία χρησιμοποιούνται διάφοροι μέθοδοι ανίχνευσης (Patrinos et al. 2008).

Ηλεκτροφόρηση σε Πηκτή Ακρυλαμίδης

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής :

Βήμα 1ο: Προετοιμάζουμε την πηκτή ακρυλαμίδης. Χρησιμοποιήθηκε ακρυλαμίδιο συγκέντρωσης 8%. Για την παρασκευή της πηκτής αναμιγνύονται 10gr ακρυλαμίδης 0,25gr δις-ακρυλαμίδης, 70ml H₂O, 10ml γλυκερόλης 50% και 8ml TBE 10X. Μόλις διαλυτοποιηθούν πλήρως όλα τα συστατικά, πραγματοποιείται διήθηση και ο όγκος ρυθμίζεται με νερό στα 125ml. Το διήθημα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και προστίθενται 125μl TEMED και 730μl APS 20%. Μετά από γρήγορη ανάδευση περιχύνουμε το διάλυμα ανάμεσα στα τζάμια και τοποθετούμε κατάλληλα χτενάκια (20 ή 15 θέσεων), τα οποία θα σχηματίσουν τα 'πηγαδάκια' της πηκτής. Αφήνουμε το διάλυμα για περίπου μισή ώρα ώσπου να πολυμεριστεί.

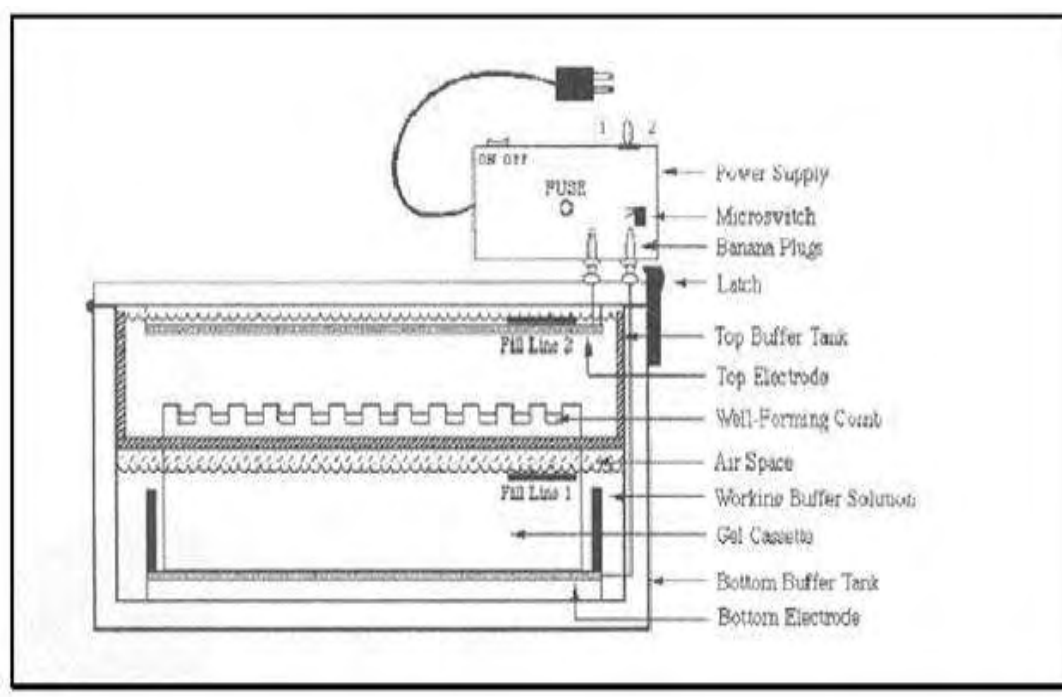
Βήμα 2ο: Μέχρι να σταθεροποιηθεί η πηκτή, προετοιμάζουμε τα δείγματα. Σε καθαρά eppendorfs χωρητικότητας 1,5 ml τοποθετούμε 5μl προϊόντος PCR και 10μl αποδιατακτικού διαλύματος (95% φορμαμίδιο, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,025% κυανού της ξυλόλης) που θα προσδώσει βάρος στο

δείγμα ώστε να κατακαθίσει στο κάτω μέρος του 'πηγαδιού'. Διατηρούμε τα δείγματα στο ψυγείο μέχρι να σχηματιστεί η πηκτή ακρυλαμίδης.

Βήμα 3ο: Μόλις σχηματίζεται η πηκτή, βγάζουμε τα τζάμια από τη συσκευή, αφαιρούμε τα χτενάκια και καθαρίζουμε τα πηγάδια καταλλήλως για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ακρυλαμίδης. Τα τζάμια στερεώνονται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης κατακόρυφα και η συσκευή συμπληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X (προέρχεται από την αραιωση 1:20 του TBE 10X).

Βήμα 4ο: Μεταφέρουμε τα δείγματα από το ψυγείο σε συσκευή PCR για αποδιάταξη ώστε να δημιουργηθούν μονόκλωνα μόρια DNA. Στη διαδικασία αποδιάταξης πραγματοποιούνται οι εξής μεταβολές θερμοκρασίας: 95°C για 2 min, 97°C για 2 min και 99°C για 7 min. Τα δείγματα τοποθετούνται αμέσως στον πάγο για να μην επανυβριδοποιηθούν οι κλώνοι.

Βήμα 5ο: Τοποθετούμε τα δείγματα με πιπέτα στα πηγάδια της πηκτής. Ρυθμίζουμε τη συσκευή στα 210V και τα δείγματα αφήνονται να τρέξουν στην πηκτή για περίπου 21 ώρες. Για τη λήψη των αποτελεσμάτων ακολουθεί χρώση του πηκτώματος.



Εικόνα 4: Συσκευή ηλεκτροφόρησης πηκτώματος ακρυλαμίδης.

Χρώση των πηκτών ακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (Silver Staining)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΰδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο. Η χρώση πραγματοποιείται υπό ανάδευση και απαιτούνται 3 διαλύματα. Η διαδικασία έχει ως εξής: Σε ογκομετρικό κύλινδρο προσθέτουμε 10ml αιθανόλη, 0,5 ml οξικό οξύ και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 400 ml (**1ο διάλυμα**). Τοποθετούμε την πηκτή σε 200ml διαλύματος όπου επώάζεται για 3 min. Απομακρύνουμε το διάλυμα και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με τα υπόλοιπα 200 ml για άλλα 3 min. Ξεπλένουμε με ddH₂O για 1 min. Απομακρύνουμε ξανά το διάλυμα με αντλία κενού και προσθέτουμε το 2ο διάλυμα που παρασκευάζεται με τη διάλυση 0,2 gr νιτρικού αργύρου σε 200ml H₂O (**2ο διάλυμα**). Ακολουθεί επώαση για 15min. Ξεπλένουμε δύο φορές με ddH₂O για 1 min. Εν τω μεταξύ έχουμε παρασκευάσει το 3ο διάλυμα ως εξής: ζυγίζουμε και τοποθετούμε σε ποτήρι ζέσεως 3 gr NaOH και 0,01 gr NaBH₄. Προσθέτουμε 200ml ddH₂O και 1ml φορμαλδεΰδη (**3ο διάλυμα**). Το διάλυμα μεταφέρεται στην πηκτή. Ακολουθεί επώαση. Σε 10-15 min, όταν δηλαδή η πηκτή έχει βαφτεί τόσο όσο να ξεχωρίζουν καθαρά οι καφέ ζώνες του DNA στο κίτρινο φόντο αφαιρούμε το διάλυμα. Ξεπλένουμε την πηκτή δύο φορές με ddH₂O για 1 min. Τέλος, αφαιρούμε κάθε περίσσεια νερού και τυλίγουμε την πηκτή σε διαφανή μεμβράνη ώστε να αποτραπεί η γρήγορη αφυδάτωσή της. Στην κατάσταση αυτή, η πηκτή ακρυλαμίδης μπορεί να διατηρηθεί για 6 περίπου μήνες. Τέλος, παρατηρούμε την πηκτή σε συσκευή προβολής.

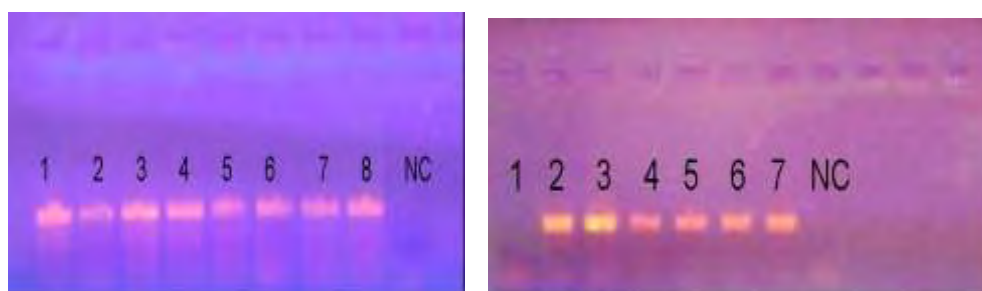
Καθαρισμός των PCR προϊόντων

Συγκεντρώθηκαν και υποβλήθηκαν εκ νέου σε PCR τελικού όγκου 50μl τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο. Περίπου 2μl από το PCR προϊόν ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% η οποία παρατηρήθηκε σε συσκευή UV για να διαπιστωθεί εάν το επιθυμητό τμήμα έχει ενισχυθεί αρκετά. Έπειτα, το προϊόν που είχε απομείνει καθαρίστηκε με kit καθαρισμού PCR προϊόντος (PureLink PCR Purification kit - Invitrogen) για την ανάκτηση καθαρού PCR προϊόντος. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με βάση εγχειρίδιο οδηγιών από τον κατασκευαστή και ο τελικός όγκος καθαρού PCR προϊόντος που απέδωσε ήταν περίπου 50μl ανά δείγμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5. ΑΝΑΛΥΣΗ PCR-SSCP

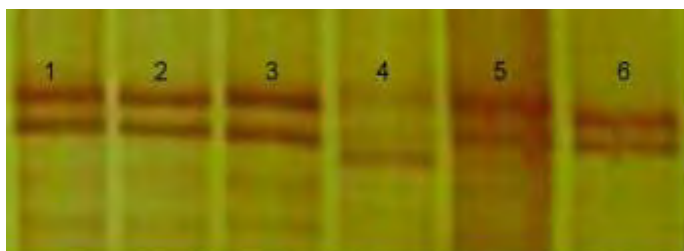
Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 150 δείγματα DNA *Lepus europaeus* από διάφορα νησιά του Αιγαίου με σκοπό τον εντοπισμό πιθανών γενετικών πολυμορφισμών σε τμήματα δύο γονιδίων του μιτοχονδριακού DNA τα οποία κωδικοποιούν υπομονάδες μιτοχονδριακών ενζύμων: την υπομονάδα 6 της συνθάσης ATP (γονίδιο *ATP6*) και την υπομονάδα 2 της οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q (γονίδιο *NADH2*). Το υλικό ήταν αρκετά καθαρό (απαλλαγμένο από πρωτεΐνες) και ικανό να δώσει ικανοποιητικά προϊόντα PCR. Η Εικόνα 5 είναι ενδεικτική των προϊόντων PCR των γονιδίων *ATP6* και *NADH2* αντίστοιχα, σε πηκτική αгарόζης.



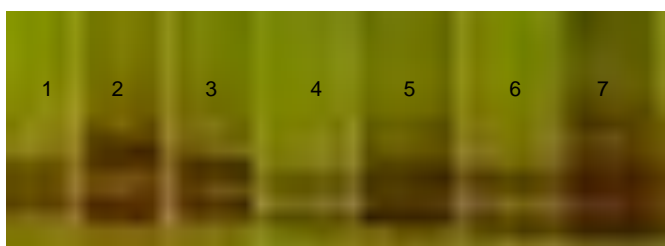
Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του γονιδίου *ATP6* (αριστερά) και *NADH2* (δεξιά). Για το *ATP6*, τα δείγματα 1-8 προέρχονται από άτομα από τη Σάμο και το δείγμα 9 αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα (NC). Για το *NADH2* τα δείγματα 1-7 προέρχονται από άτομα από τρία νησιά της Ελλάδας (Χίος, Σάμος, Μυτιλήνη). Το δείγμα 8 αντιστοιχεί στον αρνητικό μάρτυρα.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε ανάλυση SSCP με σκοπό την ταυτοποίηση των διαφορετικών προτύπων, άρα και αλληλουχιών, των προϊόντων. Η ανάλυση εφαρμόστηκε μόνο στα προϊόντα PCR που ενισχύθηκαν αποτελεσματικά. Δηλαδή, σε 74 προϊόντα PCR του γονιδίου *ATP6* και σε 74 προϊόντα του γονιδίου *NADH2*. Στις

Εικόνες 6 και 7 φαίνονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης SSCP ενδεικτικών δειγμάτων μετά από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR του γονιδίου *ATP6* και του γονιδίου *NADH2* αντίστοιχα σε πήκτωμα ακρυλαμίδης και χρώση με νιτρικό άργυρο. Στην πηκτή για το γονίδιο *ATP6* παρατηρούμε ότι τα τρία πρώτα δείγματα παρουσιάζουν το ίδιο πρότυπο. Στην πηκτή για το γονίδιο *NADH2* παρατηρούμε ότι και τα επτά δείγματα παρουσιάζουν διαφορετικό πρότυπο.



Εικόνα 6: Ανάλυση PCR-SSCP τμήματος του γονιδίου *ATP6* του *Lepus europaeus*.



Εικόνα 7: Ανάλυση PCR-SSCP τμήματος του γονιδίου *NADH2* του *Lepus europaeus*.

Ακολούθως, κάθε δείγμα αντιστοιχίστηκε σε ένα συγκεκριμένο πρότυπο και έτσι προέκυψαν 6 διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο *ATP6* και 8 διαφορετικά πρότυπα για το γονίδιο *NADH2* και επιλέχτηκε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα για κάθε πρότυπο, για προσδιορισμό της αλληλουχίας του. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BioEdit.

Στις Εικόνες 8 και 9 παρατίθενται αντίστοιχα οι αλληλουχίες που προέρχονται από τα γονίδια *ATP6* και *NADH2* μαζί με αντίστοιχες αλληλουχίες από δείγματα που είχαν μελετηθεί παλαιότερα (Καριώτη 2010, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Haplotype_1	TCCCCCAAGGACGAACCTGGGCTCTCATGCTGATCTCCCTAATTATATTTATTGGCTCAACTAACCTACTAGGCCTCTTACCACATTCATTTACACCA	100
Haplotype_2T.....	100
Haplotype_3T.....	100
Haplotype_4	100
Haplotype_5	100
Haplotype_6T.....	100
TURKEY_48_ATP6T.....	100
N_GERMANY_2_ATP6T.....	100
SERRES_3_ATP6A.....T.....	100
SPILIA_32_ATP6A.....T.....G	100
PYRRA_3_ATP6T.....G	100
TURKEY_46_ATP6T.....	100
Haplotype_1	ACAACCCAACTATCAATAAACTAGGGATAGCTATCCCATTTATGAGCAGGGGCTGTAATTACAGGATTCCGTTATAAAACTAAGGCATCACTAGCCCACT	200
Haplotype_2	200
Haplotype_3C.....	200
Haplotype_4	200
Haplotype_5	200
Haplotype_6	200
TURKEY_48_ATP6C.....	200
N_GERMANY_2_ATP6T.....C.....	200
SERRES_3_ATP6T.....C.....	200
SPILIA_32_ATP6T.....C.....T.....	200
PYRRA_3_ATP6T.....C.....T.....	200
TURKEY_46_ATP6	200
Haplotype_1	TTCTTCCACAAGGAACACCTGTTCCCCATTTCCTATACCTAGTAATTATTGAAACAATTAGTCTATTTATTCAACCCATAGCCTTAGCTGTACGACTTAC	300
Haplotype_2C.....	300
Haplotype_3C.C.....	300
Haplotype_4C.....	300
Haplotype_5	300
Haplotype_6C.....T.....	300
TURKEY_48_ATP6C.C.....	300
N_GERMANY_2_ATP6C.....A.....C.G.....	300
SERRES_3_ATP6C.....A.....C.G.....	300
SPILIA_32_ATP6C.....A.....C.G.....T.....	300
PYRRA_3_ATP6C.....A.....C.G.....T.....	300
TURKEY_46_ATP6C.....	300

Haplotype_1	AGCCAACATTACAGCAGGTCACCTACTAATACACCTCATTGGAGGCGCAGCCTTGCCCTAATCTCAATTAGTCCAACAACAGCCCTAATTACTTTAATT	400
Haplotype_2T.....	400
Haplotype_3T..C	400
Haplotype_4T.....	400
Haplotype_5T.....	400
Haplotype_6A.....T.....	400
TURKEY_48_ATP6T.....C	400
N_GERMANY_2_ATP6T.....T.....	400
SERRES_3_ATP6T.....T.....	400
SPILIA_32_ATP6T.....T.....	400
PYRRA_3_ATP6T.....T.....	400
TURKEY_46_ATP6T.....	400
Haplotype_1	ATTCTAATTCTCCTTACAATCCTAGAAATTTGCTGTGGCCCTAATTCAAGCCTA	453
Haplotype_2A.....	453
Haplotype_3G.....A.....	453
Haplotype_4	453
Haplotype_5	453
Haplotype_6A.....	453
TURKEY_48_ATP6G.....A.....	453
N_GERMANY_2_ATP6A.....	453
SERRES_3_ATP6A.....	453
SPILIA_32_ATP6A.....	453
PYRRA_3_ATP6A.....	453
TURKEY_46_ATP6A.....	453

Εικόνα 8: Απλότυποι για το γονίδιο ATP6 ατόμων *Lepus europaeus* από περιοχές της Ελλάδας, της Γερμανίας και της Τουρκίας. Το χρώμα είναι διαφορετικό και χαρακτηριστικό για την κάθε βάση. Οι κουκίδες στις αλληλουχίες συμβολίζουν την ομοιότητα των βάσεων ως προς την πρώτη αλληλουχία. Οι βάσεις οι οποίες διαφοροποιούνται σε σχέση με την πρώτη αλληλουχία αναγράφονται με το αρχικό τους γράμμα. Ο αριθμός που αναγράφεται δεξιά της αλληλουχίας υποδεικνύει την αρίθμηση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων PCR. Οι αλληλουχίες Haplotype_1 έως Haplotype_6 αντιστοιχούν στα δείγματα που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία και οι υπόλοιπες στα δείγματα που είχαν μελετηθεί παλαιότερα (Καριώτη 2010, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Haplotype_1	TAAGGCCACACCACGATCAACAGAAGCTGCAACTAAATATTTTCTAACACAAGCCACAGCATCAATAATTTTAAATAATAGCTATCACACTTAACATCCTT	100
Haplotype_2G.....	100
Haplotype_3	100
Haplotype_4	100
Haplotype_5G.....	100
Haplotype_6G.....	100
Haplotype_7G.....	100
Haplotype_8G.....	100
Turkey51-NADH2	100
Turkey31-NADH2	100
N. Israel3-NADH2	100
Turkey48-NADH2	100
S.W. Germany4-NADH2C.....	100
S.W. Germany5-NADH2C.....	100
Italy4-NADH2T.....	100
Grevena3-NADH2C.....	100
Haplotype_1	GACTCGGGCCAATGAACACTAATTAAACCCACAAATCAGCTTTACACCAATCATAATTATACAGCCCTAATTATTAAACTAGGAATAGCCCCCTTCCACT	200
Haplotype_2	200
Haplotype_3	200
Haplotype_4	200
Haplotype_5	200
Haplotype_6	200
Haplotype_7	200
Haplotype_8	200
Turkey51-NADH2	200
Turkey31-NADH2	200
N. Israel3-NADH2	200
Turkey48-NADH2T.....	200
S.W. Germany4-NADH2	...A.....G.....G.....	200
S.W. Germany5-NADH2	...A.....T.....G.....G.....	200
Italy4-NADH2G.....G.....G.....	200
Grevena3-NADH2G.....G.....	200

Haplotype_1	TCTGAGTACCAGAAGTCACCCAAGGAGTCCCCCTAAAAATCAGGCCTTATTCTCCTTACGTGACAAAAACTAGCCCCCTATCCATTCTTTATCAGATTTTC	300
Haplotype_2A.....	300
Haplotype_3T.....	300
Haplotype_4	.T.....T.....	300
Haplotype_5G.....A.....	300
Haplotype_6A.....	300
Haplotype_7T.....	300
Haplotype_8T.....	300
Turkey51-NADH2	.T.....T.....	300
Turkey31-NADH2T.....T.....	300
N. Israel3-NADH2T.....	300
Turkey48-NADH2	.T.....T.....C.....	300
S.W.Germany4-NADH2G.....G.....T.....C.....A.....	300
S.W.Germany5-NADH2G.....G.....T.....C.....A.....	300
Italy4-NADH2G.....G.....T.....C.....	300
Grevena3-NADH2G.....T.....C.....	300
Haplotype_1	TCCCTCTATTGACTCAACTATAATAATACTAGTAGCTATTCTCTCAATCATAGTTGGTGGCTGAGGAGGACTAAACCAGACTCAACTACGAAAGATCCTA	400
Haplotype_2C.....	400
Haplotype_3	400
Haplotype_4A.....	400
Haplotype_5	400
Haplotype_6	400
Haplotype_7A.....	400
Haplotype_8	400
Turkey51-NADH2A.....	400
Turkey31-NADH2	400
N. Israel3-NADH2	400
Turkey48-NADH2	400
S.W.Germany4-NADH2	.T.....G.....T.....	400
S.W.Germany5-NADH2	.T.....G.....	400
Italy4-NADH2	.T.....	400
Grevena3-NADH2	.T.....	400

Haplotype_1	GCGTATTCCCTCAATTGCCCA	420
Haplotype_2	420
Haplotype_3	420
Haplotype_4	420
Haplotype_5	420
Haplotype_6	420
Haplotype_7	420
Haplotype_8	420
Turkey51-NADH2	420
Turkey31-NADH2	420
N. Israel3-NADH2	420
Turkey48-NADH2	420
S.W. Germany4-NADH2	420
S.W. Germany5-NADH2	420
Italy4-NADH2	420
Grevena3-NADH2	420

Εικόνα 9: Απλότυποι για το γονίδιο NADH2 ατόμων *Lepus europaeus* από περιοχές της Ελλάδας, της Γερμανίας, της Ιταλίας και της Ανατολής. Το χρώμα είναι διαφορετικό και χαρακτηριστικό για την κάθε βάση. Οι κουκίδες στις αλληλουχίες συμβολίζουν την ομοιότητα των βάσεων ως προς την πρώτη αλληλουχία. Οι βάσεις οι οποίες διαφοροποιούνται σε σχέση με την πρώτη αλληλουχία αναγράφονται με το αρχικό τους γράμμα. Ο αριθμός που αναγράφεται δεξιά της αλληλουχίας υποδεικνύει την αρίθμηση των νουκλεοτιδίων των προϊόντων PCR. Οι αλληλουχίες Haplotype_1 έως Haplotype_8 αντιστοιχούν στα δείγματα που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία και οι υπόλοιπες στα δείγματα που είχαν μελετηθεί παλαιότερα (Καριώτη 2010, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας)

Όλες οι αντικαταστάσεις βάσεων για τα γονίδια *ATP6* και *NADH2* αντίστοιχα που παρατηρούνται στις παραπάνω αλληλουχίες παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4 τόσο για τα δείγματα που μελετήθηκαν σε αυτήν την εργασία όσο και για τα δείγματα που είχαν μελετηθεί παλαιότερα (Καριώτη 2010, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας).

Πίνακας 3: Αντικαταστάσεις βάσεων στο γονίδιο *ATP6*.

Πολυμορφικές θέσεις	Βάσεις
56	G,A
68	C,A
85	A,T
100	A,G
110	C,T
121	T,C
196	C,T
205	T,C
223	T,A
232	T,C
235	T,C
238	A,G
277	C,T
292	A,T
328	A,T
356	G,A
359	C,T
397	A,T
400	T,C
407	A,G
415	T,A

* Η αρίθμηση αναφέρεται στο προϊόν *PCR* και είναι σε συμφωνία με την Εικόνα 7.

Πίνακας 4: Αντικαταστάσεις βάσεων στο γονίδιο NADH2.

Πολυμορφικές θέσεις	Βάσεις
67	A,G
82	T,C
97	C,T
106	G,A
127	C,T
143	A,G
161	C,T
178	A,G
187	A,G
202	C,T
208	A,G
229	C,T
235	A,G
241	A,G
244	C,T-C,A
250	T,C
259	G,A
302	C,T
322	A,G
343	C,T
353	G,A
354	T,C

* Η αρίθμηση αναφέρεται στο προϊόν PCR και είναι σε συμφωνία με την Εικόνα 8

Με βάση τα αποτελέσματα της αλληλούχησης, επιβεβαιώθηκε η διαφορετικότητα κάθε προτύπου SSCP, και κάθε δείγμα αντιστοιχίσθηκε σε μία συγκεκριμένη αλληλουχία. Στον Πίνακα 5 καταγράφονται όλα τα άτομα με τους κωδικούς τους και οι αντίστοιχοι απλότυποι.

Πίνακας 5: Τα άτομα με τους κωδικούς τους που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη και οι απλότυποι που προέκυψαν για κάθε γονίδιο.

Δείγματα	Απλότυποι-ATP6	Απλότυποι-NADH2
Ρόδος 1	2	7
Ρόδος 2	2	7
Ρόδος 3	6	1
Ρόδος 51	1	7
Ρόδος 53	2	1
Ρόδος Τσαϊλάκι	1	3
Μυτιλήνη 1	2	7
Μυτιλήνη 2	2	7
Μυτιλήνη 5	1	6
Μυτιλήνη 7	5	3
Μυτιλήνη 8	2	6
Μυτιλήνη 10	5	2
Μυτιλήνη 11	3	6
Μυτιλήνη 12	2	5
Μυτιλήνη 13	1	5
Μυτιλήνη 15	2	7
Μυτιλήνη 16	1	2
Μυτιλήνη 17	5	3
Μυτιλήνη 19	5	4
Χίος 1	2	8
Χίος 2	2	7
Χίος 3	1	7
Χίος 4	1	7
Χίος 5	1	7
Χίος 6	1	7
Χίος 7	1	6
Χίος 8	1	7
Χίος 9	1	7
Χίος 10	1	6
Χίος 11	2	7
Χίος 12	2	7
Χίος 13	2	7
Χίος 14	1	7
Χίος 15	1	7
Χίος 16	1	7
Χίος 17	1	7
Χίος 18	1	6
Χίος 19	3	6
Χίος 20	2	6

Δείγματα	Απλότυποι-<i>ATP6</i>	Απλότυποι-<i>NADH2</i>
Σάμος 1	2	7
Σάμος 4	2	7
Σάμος 5	2	8
Σάμος 6	4	6
Σάμος 7	3	7
Σάμος 8	2	8
Σάμος 10	1	6
Σάμος 11	1	6
Σάμος 14	1	6
Σάμος 15	1	6
Σάμος 18	1	6
Σάμος 19	1	5
Σάμος 20	2	6
Σάμος 21	1	6
Σάμος 22	1	6
Σάμος 23	1	6
Σάμος 24	1	6
Σάμος 25	1	6
Σάμος 29	1	6
Σάμος 30	4	6
Σάμος 31	4	6
Σάμος 32	4	6
Σάμος 33	1	6
Σάμος 35	4	5
Σάμος 37	1	7
Σάμος 38	1	6
Σάμος 40	3	8
Σάμος 41	1	6
Σάμος 42	1	6
Σάμος 43	1	6
Σάμος 44	1	5
Σάμος 45	1	7
Σάμος 46	1	6
Σάμος 47	1	5
Σάμος 65	4	5

Όπως απεικονίζεται και στους χάρτες στις Εικόνες 10 και 11 για το γονίδιο *ATP6* οι απλότυποι που εμφανίζονται στη Μυτιλήνη είναι οι 1, 2, 3, 5, στη Χίο οι 1, 2, 3, στη Σάμο οι 1, 2, 3, 4 και στη Ρόδο οι 1, 2 και 6. Αντίστοιχα για το γονίδιο *NADH2* οι απλότυποι που εμφανίζονται στη Μυτιλήνη είναι οι 2, 3, 4, 5, 6, 7, στη Χίο οι 6, 7, 8, στη Σάμο οι 5, 6, 7, 8, και στη Ρόδο οι 1, 2 και 7.

Παρατηρούμε ότι για το γονίδιο *ATP6* οι απλότυποι 1, 2 εμφανίζονται και στα τέσσερα νησιά. Ο απλότυπος 3 εμφανίζεται μόνο στα νησιά του ΒΑ Αιγαίου και απουσιάζει από τη Ρόδο. Παράλληλα, για το γονίδιο *NADH2* παρατηρούμε ότι οι

απλότυποι 5, 6, και 7 είναι κοινοί για τα νησιά Μυτιλήνη και Σάμο. Ο απλότυπος 7 είναι ο μοναδικός που εμφανίζεται και στα τέσσερα νησιά.

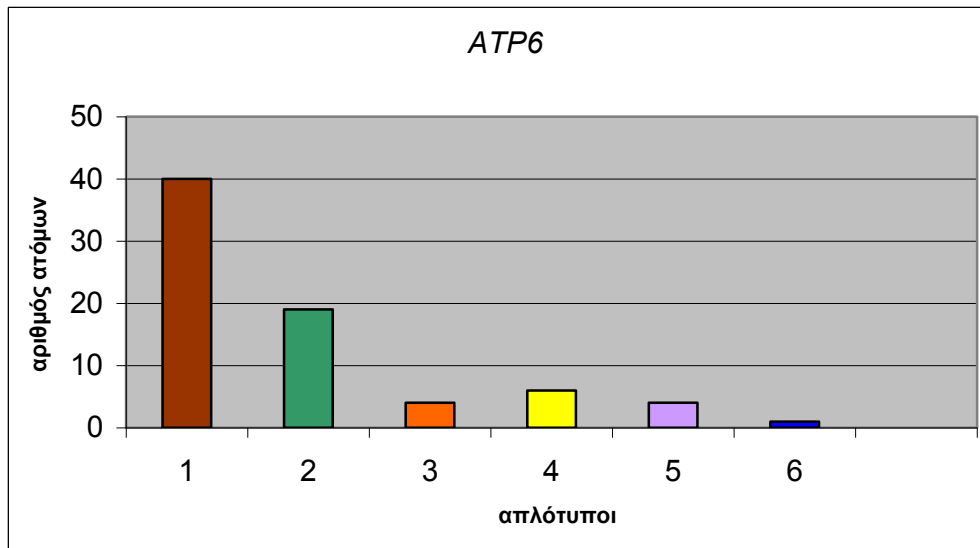


Εικόνα 10: Απλότυποι για το γονίδιο ATP6 ατόμων *Lepus europaeus* που εμφανίζονται σε νησιά της Ελλάδας

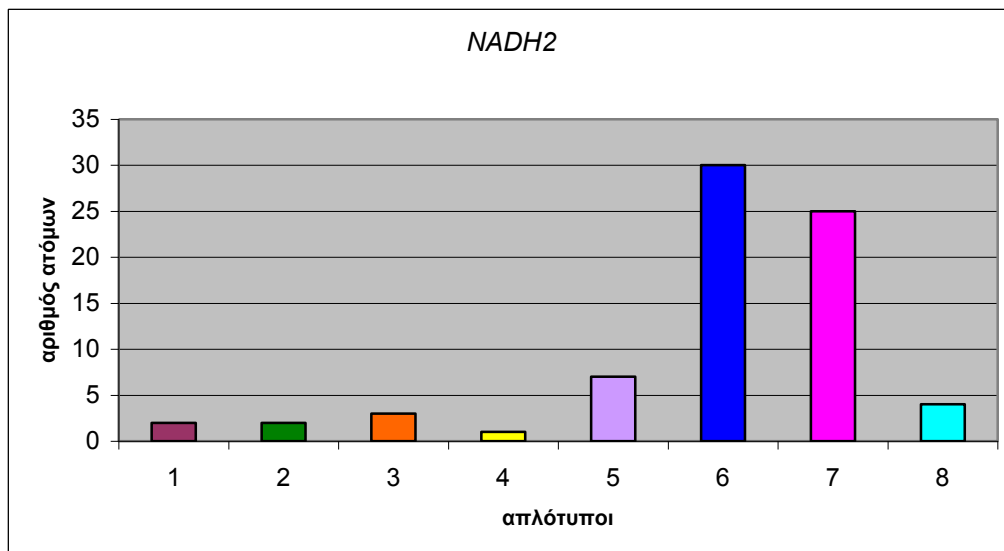


Εικόνα 11: Απλότυποι για το γονίδιο NADH2 ατόμων *Lepus europaeus* που εμφανίζονται σε νησιά της Ελλάδας

Στις εικόνες 12 και 13 φαίνεται ο συνολικός αριθμός των ατόμων *Lepus Europaesus*, που μελετήθηκαν στην εργασία αυτή, που αντιστοιχεί σε κάθε απλότυπο του κάθε γονιδίου. Από το γράφημα 1, για το γονίδιο *ATP6*, φαίνεται ότι οι απλότυποι 1 και 2 είναι οι πιο συχνοί. Για το γονίδιο *NADH2*, από το γράφημα 2 γίνεται φανερό ότι πιο συχνοί είναι οι απλότυποι 6 και 7.



Εικόνα 12: Αριθμός ατόμων *Lepus europaeus* που φέρουν ένα συγκεκριμένο απλότυπο για το γονίδιο *ATP6*.

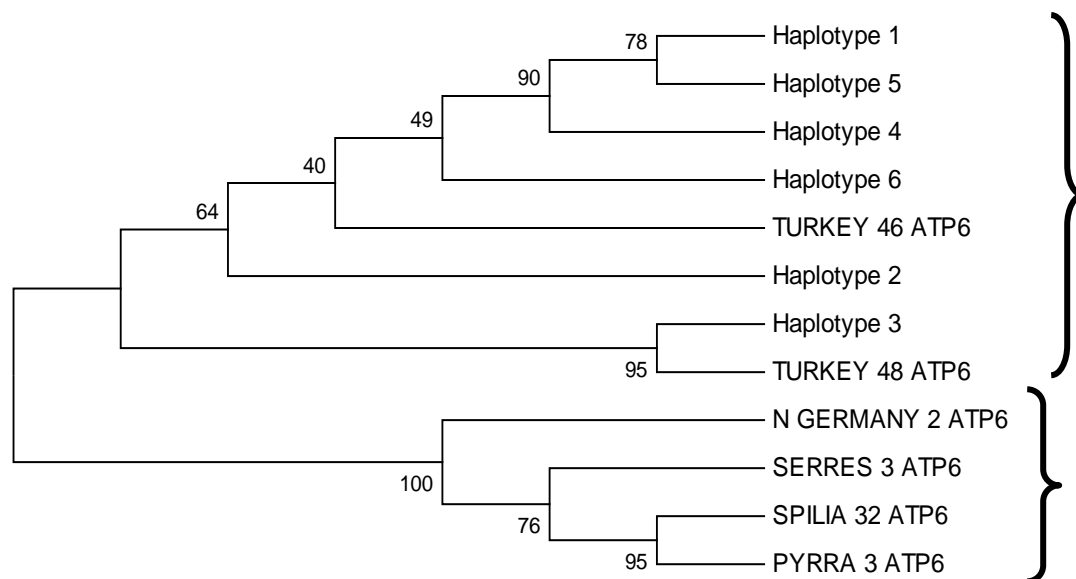


Εικόνα 13: Αριθμός ατόμων *Lepus europaeus* που φέρουν ένα συγκεκριμένο απλότυπο για το γονίδιο *NADH2*.

Αναλύοντας την ομοιότητα των αλληλουχιών του γονιδίου *ATP6*, παρατηρούμε πως για τους Haplotype_1- Haplotype_5 και Haplotype_4- Haplotype_5 οι αλληλουχίες τους διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο. Για τα ζεύγη Haplotype_1- Haplotype_4, Haplotype_2- Haplotype_4, Haplotype_2-Haplotype_5, Haplotype_2-Haplotype_6, Haplotype_3-TURKEY48 και Haplotype_6-TURKEY46 η διαφορά των αλληλουχιών τους εντοπίζεται σε δυο νουκλεοτίδια. Κατά τρία νουκλεοτίδια διαφέρουν οι αλληλουχίες των απλοτύπων Haplotype_5-TURKEY46 και N.GERMANY2-PYRRA3. Επίσης, μικρή διαφορά, τεσσάρων νουκλεοτιδίων παρατηρούμε και για τα εξής ζεύγη : TURKEY46- Haplotype_1, Haplotype_2- Haplotype_3, Haplotype_2- TURKEY48, Haplotype_4- Haplotype_6, TURKEY48- TURKEY46, N.GERMANY2-SPILIA32 και PYRRA3-SERRES3.

Αντίθετα βλέπουμε μεγάλη διαφορά μεταξύ της αλληλουχίας του Haplotype_1 με την αλληλουχία του SPILIA32. Διαφέρουν μεταξύ τους κατά 15 νουκλεοτίδια. Όμοια και οι αλληλουχίες των Haplotype1 και PYRRA3 παρουσιάζουν διαφορά δεκατεσσάρων νουκλεοτιδίων. Παράλληλα, οι αλληλουχίες των Haplotype_4-SPILIA32, Haplotype_5-PYRRA3, Haplotype_6-SPILIA32 και TYRKEY48-SPILIA32 εμφάνισαν διαφορά σε δεκατρία νουκλεοτίδια.

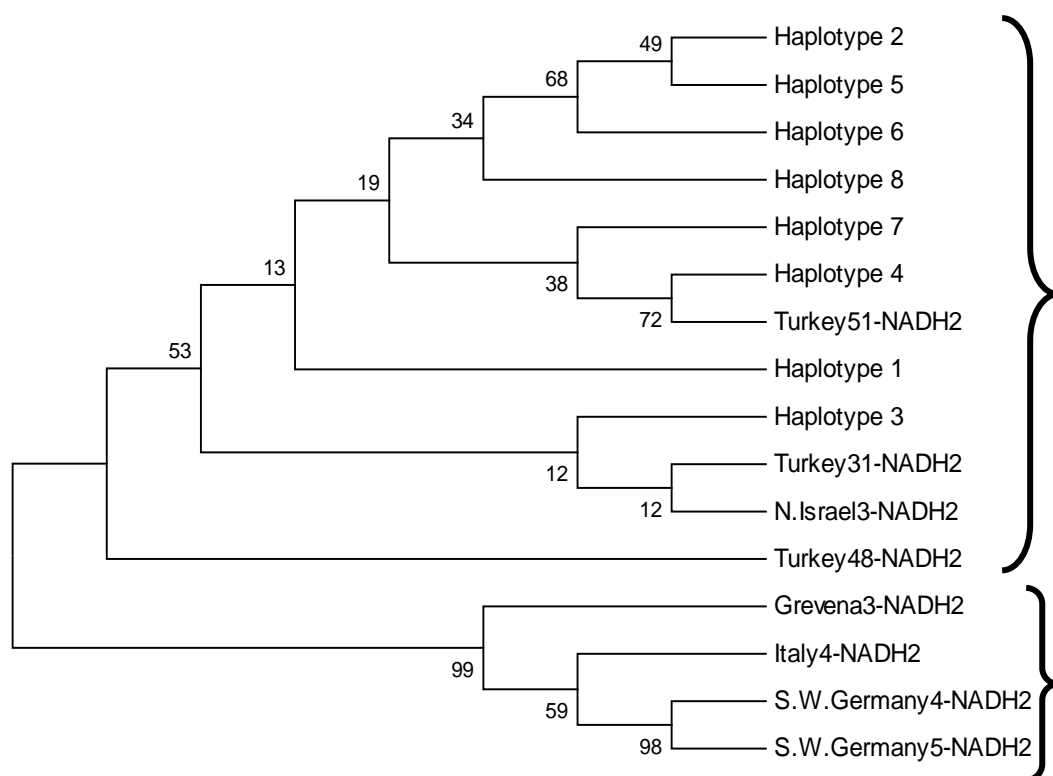
Επίσης μεγάλη διαφορά, δώδεκα νουκλεοτιδίων, παρουσίασαν οι Haplotype_1 με SERRES3, Haplotype_3 , Haplotype_4, Haplotype_6 και TYRKEY48 με PYRRA3 καθώς και οι Haplotype_5 με SPILIA32. Διαφορές έντεκα και δέκα νουκλεοτιδίων παρατηρήθηκαν μεταξύ των αλληλουχιών των απλοτύπων που αντιστοιχούν σε δείγματα από τα νησιά του Αιγαίου(Σάμο, Μυτιλήνη, Χίο, Ρόδο) με τις αλληλουχίες των απλοτύπων που αντιπροσωπεύουν δείγματα από την ηπειρωτική Ελλάδα και τη Β. Γερμανία. Η απεικόνιση της ομοιότητας/διαφοροποίησης των αλληλουχιών έγινε με την κατασκευή του δένδρου (Εικόνα 14)



Εικόνα 14: Στο δενδρόγραμμα γίνεται εμφανής ο διαχωρισμός των *Lepus europaeus* που προέρχονται από την Τουρκία και τα νησιά του Αιγαίου (πάνω κλάδος) από τους *Lepus europaeus* της κεντρικής Ελλάδας και της Ευρώπης (κάτω κλάδος), βάσει του γονιδίου ATP6.

Όσον αφορά το γονίδιο *NADH2* αναλύοντας την ομοιότητα/διαφορά των αλληλουχιών του παρατηρούμε πως οι Haplotype_8, Haplotype_1 και Turkey31 διαφέρουν κατά 12 νουκλεοτίδια από S.W. Germany4 και S.W. Germany5. Κατά 13 νουκλεοτίδια διαφέρουν επίσης από S.W. Germany4 και S.W. Germany5 οι Haplotype_4 και Haplotype_6. Επίσης, η αλληλουχία του Haplotype_1 διαφέρει κατά 7 νουκλεοτίδια από Grevena3, κατά 2 από Turkey31 και κατά 1 νουκλεοτίδιο από N. Israel3. Η αλληλουχία του Italy4 διαφέρει κατά 11 νουκλεοτίδια με τις αλληλουχίες των Haplotype_2 και Haplotype_5, κατά 10 νουκλεοτίδια με τις αλληλουχίες των Haplotype_7 και Haplotype_6 και κατά 9 νουκλεοτίδια με τις αλληλουχίες των Haplotype_4 και Turkey31. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι αλληλουχίες των Haplotype_4 και Turkey51 οι οποίες δεν παρουσιάζουν καμία διαφορά μεταξύ τους. Τέλος μικρή διαφορά παρατηρούμε στις αλληλουχίες των Haplotype_1, Turkey31 και Haplotype_8 σε σχέση με την αλληλουχία του N.Israel13 καθώς και στις αλληλουχίες των Haplotype_3, Turkey31 και Turkey51 που διαφέρουν κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Όπως για το γονίδιο *ATP* έτσι και για το

γονίδιο *NADH2* καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι απλοτύποι που αντιστοιχούν σε δείγματα από τα νησιά του Αιγαίου(Σάμο, Μυτιλήνη, Χίο, Ρόδο) εμφανίζουν ομοιότητα με τους απλότυπους που αντιστοιχούν σε δείγματα της Ανατολής (Τουρκία, Ισραήλ) και αρκετά μεγάλη διαφορά με τους απλότυπους των πληθυσμών της ηπειρωτικής Ελλάδας και της Ευρώπης. Η απεικόνιση της ομοιότητας/διαφοροποίησης των αλληλουχιών έγινε με την κατασκευή του δένδρου (Εικόνα 15).



Εικόνα 15: Στο δενδρόγραμμα γίνεται εμφανής ο διαχωρισμός των *Lepus europaeus* που προέρχονται από την ηπειρωτική Ελλάδα και την Ευρώπη (1^{ος} βασικός κλάδος) από τους *Lepus europaeus* της Ανατολής (Τουρκία και Ισραήλ) και των νησιών του Αιγαίου (2^{ος} βασικός κλάδος), βάσει του γονιδίου *NADH2*.

Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι και για τα δύο γονίδια(*ATP6*, *NADH2*) παρατηρείται ομαδοποίηση μεταξύ των απλότυπων που αφορούν τα νησιά του

Αιγαίου και την Ανατολή (Τουρκία, Ισραήλ), οι οποίοι διαχωρίζονται σαφώς από αυτούς της ηπειρωτικής Ελλάδας και της Ευρώπης.

Το συμπέρασμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των *Kasapidis et al* (2004) η μελέτη των οποίων ανέχνευσε ότι οι λαοί της Ηπειρωτικής Ελλάδας, της Πελοποννήσου, των Ιονίων νήσων, της Κρήτης και της Νάξου, ανήκουν στον "δυτικό τύπο" και είναι γενετικά συγγενείς με τους πληθυσμούς της Ιταλίας και της Κεντρικής Ευρώπης. Αντίθετα οι πληθυσμοί των νησιών του Ανατολικού Αιγαίου και της Θράκης είναι αρκετά διαφορετικοί και ανήκουν στον "ανατολικό τύπο"

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E.,Reeb C.A., Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18:489-522.
2. Awadalla P, Eyre-Walker A, Maynard Smith J (24 December 1999). "Linkage Disequilibrium and Recombination in Hominid Mitochondrial DNA". *Science*. 286 (5449): 2524-2525.
3. Bansfield, A. (1974). *Mammals of Canada*.
4. Brock, 2005. Βιολογία των μικροοργανισμών.
5. Campbell, Neil A.: Brad Williamson; Robin J. Heyden (2006). *Biology: Exploring Life*. Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall.
6. Cavalier-Smith T. 1975. The origin of nuclei and eukaryotic cells. *Nature* 256: 463-468.
7. Dragg, A. (1974) *Mammals of Ontario*. Waterloo, Ontario: Otter Press
8. Fickel J, Lieckfeldt D, Pitra C (1999) Analysis of genetic diversity and structure in neighboring populations of the European brown hare (*Lepus europaeus*, Pallas 1778). *Zeitschrift fur Jagdwissenschaft*, 45,230-237.
9. Garrigan D, Hammer MF (2006). "Reconstructing human origins in the genomic era". *Nat. Rev. Genet.* 7 (9): 669-80.
10. Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008). "Plastid evolution
11. Hamilton, W., J. Whitaker. (1943) *Mammals of the Eastern United States*. 2nd ed. Ithica, NY: Cornell University Press
12. Hunder, M. (1995) «Fundamentals of Conservation Biology» Blackwell Science, p:482
13. Hunder, M. (2001) «Biological diversity» in *Maintaining Biodiversity in Forest Ecosystems* Cambridge, University Press
14. Hubby L. and. Lewontin R. C, "A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. I. The Number of Alleles at Different Loci in *Drosophila pseudoobscura*," *Genetics* 54 (1966): 546-595.
15. Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G (2005) The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*)

under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 34, 55-66.

16. Lincoln, G. (1974). Reproduction and March madness in the Brown hare, *Lepus europaeus*. *J. Zool. Lond.*, 174: 1-14.

17. Mamuris Z., Koutsogiannouli E.A, Moutou K.A., Sarafidou Th., Stamatis C., Spyrou V., (2009) Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus 1 in the brown hare (*Lepus europaeus*)

18. Mamuris Z., Sfougaris A.I., Stamatis C., Suchentrunk F. (2002) Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biochemical Genetics*, 40, 323-38.

19. Margulis L. 1981. *Symbiosis in Cell Evolution: Life and Its Environment in the Early Earth*. Freeman, San Francisco.

20. Martz, G. (1977) «Προστασία του περιβάλλοντος» (μετάφρ. Παπαδοπούλου, Ν.) Αθήνα: Γκιούρδας, Μ.

21. Norse, E., Rosenbaum, K., Wilcove, D., Wilcox, B., Romme, W., Johnston, D. & Stout, M. (1986) «*Conserving biological diversity in our national forests. The Wilderness Society*» Washington, DC

22. Omland, K.E., Lanyon, S.M., Fritz, S.J. Mo/. *Phylogenet. Evol.* {1999) A molecular phylogeny of the New World orioles (*Icterus*): the importance of dense taxon sampling

23. Ozawa T (1995) Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases

24. Patrinos P.George, Ansorge Wilhelm, (2008) Μοριακή διαγνωστική. Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισσιανού

25. Poli, A., M. Nigro, D. Gallazi, G. Sironi, A. Lavazza. (1991). Acute hepatitis in the European brown hare (*Lepus europaeus*) in Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 27(4): 621-629.

26. Roellig K, Goeritz F, and Hildebrandt TB (2010) Ultrasonographic characterisation of prenatal development in European brown hares (*Lepus europaeus* PALLAS, 1778): an evolutionary approach.

27. Sert H, Suchentrunk F, Erdogan A (2005) Genetic diversity in brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from Anatolia and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammalian Biology*, 70, 171-186.

28. Slimen Ben H, Suchentrunk F, Stamatis C et al. (2008) Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): A test of Petter's hypothesis of conspecificity. *Biochemical Systematics and Ecology*
29. Smith, A.T. & Johnston, C.H. (2008) *Lepus europaeus*. In IUCN: Red List of Threatened Species. Version 2010.3
30. Stamatis C, Giannouli S, Suchentrunk F et al. (2008) Recruitment of mitochondrial tRNA genes as auxiliary variability markers for both intra- and inter-species analysis: The paradigm of brown hare (*Lepus europaeus*). *Gene*, 410, 154-164.
31. Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou KA et al (2009) Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia?. *Journal of Biogeography*, 36, 515-528
32. Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7, 822 453-64.
33. Thompson 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.
34. Uzzell T., Spolsky C. 1981. Two data sets: alternative explanations and interpretations. *Annals of the New Yorks Academy of Sciences* 361: 481-499.
35. Wilson A.C., Carlson S.S., White T.J. 1977. Biochemical evolution. *Annual Reviews of Biochemistry* 46: 473-639.
36. Weisrock, D.W., Harmon, L.J., Larson, A. *Syst. Biol.* (2005) Resolving deep phylogenetic relationships in salamanders: analyses of mitochondrial and nuclear genomic data.
37. Wise Cheryl A., Sraml Michaela and Simon Easteal (1998) Departure from Neutrality at the Mitochondrial NADH Dehydrogenase Subunit 2 Gene in Humans, but Not in Chimpanzees
38. Yu L., Zhang, Y.P (2005) Phylogenetic studies of pantherine cats (*Felidae*) based on multiple genes, with novel application of nuclear beta-fibrinogen intron 7 to carnivores
39. Αντωνίου Αγλαία, (2008) Διευρεύνηση της εξελικτικής ιστορίας του Ευρωπαϊκού λαγού (*Lepus europaeus*) στη βαλκανική. Πανεπιστήμιο Κρήτης

40. Καρατάσος, Ν., Κεφαλογιάννη, Ζ., Ζακανάλη, Α., Παπαζαφειρόπουλος, Ζ., & Χαιρέτη, Μ., (2009) «*Βιοποικιλότητα και Ενδημισμός στον Ψηλορείτη*» Ηράκλειο: Γραφικές Τέχνες
41. Μαργαρίτης Λ.Χ., Γαλανόπουλος Β.Κ, Κεραμάρης Κ.Ε., Μαρίνος Ε.Σ., Παπασιδέρη Ι.Σ., Στραβοπόδης Δ.Ι., Τρουγκάκος Ι.Π., Βιολογία Κυττάρου, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Τέταρτη έκδοση, Αθήνα, 2004
42. Μαρδίρης, Θ., Αντωνίου, Ν., Μηντζιαρίδης, Κ., Γρηγορίου, Μ., Ατζέμη, Α., Τζέρπος, Κ., & Πισιώτη, Α., (2005) *Βιοποικιλότητα, Το Εργαστήρι της ζωής*. Καστοριά: ΥΠ.Ε.Π.Θ
43. Μελιάδου, Α., (2000), «*Βιοποικιλότητα (Οδηγός Εκπαιδευτικών)*» Αθήνα: ΥΠ.Ε.Π.Θ.
44. Ντάφης, Σ., Παπαστεργιάδου, Ε., Γεωργίου, Κ., Μπαμπαλωνάς, Ζ., Γεωργιάδης, Θ., Παπαγεωργίου, Μ., Λαζαρίδου, Θ. & Τσιαούση, Β. (1997) «*Οδηγία 92/43/ΕΟΚ. Το έργο των οικοτόπων στην Ελλάδα: (ίκτυο ΦΥΣΗ 2000)*» Συμβόλαιο αριθμός Β4-3200/84/756, Γεν. Διεύθυνση ΧΙ Επιτροπή Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας – Ελληνικό Κέντρο Βιοτόπων Υγροτόπων σελ:932 Θεσσαλονίκη: Anima Graphics
45. Τριανταφυλλίδης Κωνσταντίνος, Κλασική και Μοριακή Γενετική, Θεσσαλονίκη, 1992.

